

17.12.2004

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出願年月日 2003年10月24日  
Date of Application:

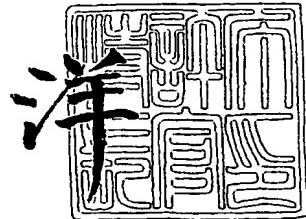
出願番号 特願2003-364682  
Application Number:  
[ST. 10/C]: [JP2003-364682]

出願人 日本たばこ産業株式会社  
Applicant(s):

2005年2月3日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



出証番号 出証特2005-3006221

**【書類名】** 特許願  
**【整理番号】** 031959  
**【提出日】** 平成15年10月24日  
**【あて先】** 特許庁長官 殿  
**【国際特許分類】** C12N  
**【発明者】**  
**【住所又は居所】** 静岡県磐田郡豊田町東原700番地 日本たばこ産業株式会社  
**【氏名】** 植物イノベーションセンター内  
**久保 友明**  
**【発明者】**  
**【住所又は居所】** 静岡県磐田郡豊田町東原700番地 日本たばこ産業株式会社  
**【氏名】** 植物イノベーションセンター内  
**小鞠 敏彦**  
**【発明者】**  
**【住所又は居所】** 静岡県磐田郡豊田町東原700番地 日本たばこ産業株式会社  
**【氏名】** 植物イノベーションセンター内  
**宇佐美 悟**  
**【発明者】**  
**【住所又は居所】** 静岡県磐田郡豊田町東原700番地 日本たばこ産業株式会社  
**【氏名】** 植物イノベーションセンター内  
**高倉 由光**  
**【発明者】**  
**【住所又は居所】** 静岡県磐田郡豊田町東原700番地 日本たばこ産業株式会社  
**【氏名】** 植物イノベーションセンター内  
**樋江井 祐弘**  
**【発明者】**  
**【住所又は居所】** 静岡県磐田郡豊田町東原700番地 日本たばこ産業株式会社  
**【氏名】** 植物イノベーションセンター内  
**石田 祐二**  
**【特許出願人】**  
**【識別番号】** 000004569  
**【氏名又は名称】** 日本たばこ産業株式会社  
**【代理人】**  
**【識別番号】** 100089705  
**【住所又は居所】** 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区  
 ユアサハラ法律特許事務所  
**【弁理士】**  
**【氏名又は名称】** 社本 一夫  
**【電話番号】** 03-3270-6641  
**【ファクシミリ番号】** 03-3246-0233  
**【選任した代理人】**  
**【識別番号】** 100076691  
**【弁理士】**  
**【氏名又は名称】** 増井 忠武  
**【選任した代理人】**  
**【識別番号】** 100075270  
**【弁理士】**  
**【氏名又は名称】** 小林 泰

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100080137

【弁理士】

【氏名又は名称】 千葉 昭男

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100096013

【弁理士】

【氏名又は名称】 富田 博行

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100092886

【弁理士】

【氏名又は名称】 村上 清

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 051806

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 特許請求の範囲 1

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0302083

**【書類名】特許請求の範囲****【請求項 1】**

以下の工程を含むことを特徴とする、植物に農業上有益となりうる変異をもたらすことができるゲノムDNA断片の選抜方法：

- (1) 植物からゲノムDNAを調製し、クローニングベクターを用いて、ゲノムDNAライプラリーを構築する；
- (2) ゲノムDNAライプラリーを構成する複数のゲノムクローンの各々に含まれるゲノム断片を、個別に植物に導入し、形質転換植物を作出する；
- (3) 形質転換植物、または、その子孫の植物を栽培し、表現型に農業上有益となりうる変異の生じた植物を選抜する；
- (4) 工程(3)において選抜された植物に、工程(2)において導入されていたゲノムDNA断片を、目的とするゲノムDNA断片として選抜する；
- (5) 場合により、工程(4)で選抜されたゲノムDNA断片の全部または一部を植物に導入して、工程(3)および(4)を繰返し、各繰返しの度に表現型に農業上有益となりうる変異の生じた植物を与えたゲノムDNA断片を、目的とするゲノムDNA断片として選抜する。

**【請求項 2】**

選択されるゲノムDNA断片のサイズが、クローニングベクターに導入可能な大きさの範囲で、1kb以上である請求項1の方法。

**【請求項 3】**

工程(2)が、植物細胞もしくは組織のゲノムへのゲノム断片の導入、該植物細胞のカルス化、該カルスからの植物体への再生、再生した植物の栽培、の各工程を含む、請求項1または2の選抜方法。

**【請求項 4】**

植物細胞もしくは組織のゲノムへのゲノムDNA断片の導入が、生物的導入法、物理的導入法、化学的導入法からなる群から選択される方法により行われる、請求項3の選抜方法。

**【請求項 5】**

植物に農業上有益となりうる変異が、通常の栽培条件下で植物体およびその含有成分の少なくとも一部について、変異がない植物に比べて量的な増大または減少、または、その生長速度の増大をもたらす変異、または病虫害抵抗性をもたらす変異である、請求項1～4のいずれか1項の選抜方法。

**【請求項 6】**

植物に農業上有益となりうる変異が、通常より植物にストレスが付加される栽培条件下で植物体およびその含有成分の少なくとも一部について、変異がない植物に比べて量的な増大または減少、または、その生長速度の増大をもたらす変異、または病虫害抵抗性をもたらす変異である、請求項1～4のいずれか1項の選抜方法。

**【請求項 7】**

工程(2)で形質転換される植物が、工程(1)でゲノムDNAの供給源とされた植物と同じ種の植物である、請求項5または6の選抜方法。

**【請求項 8】**

工程(2)で形質転換される植物が、工程(1)でゲノムDNAの供給源とされた植物と異なる種の植物である、請求項5または6の選抜方法。

**【請求項 9】**

場合により工程(5)でゲノムDNA断片を導入する植物が、工程(2)で形質転換された植物と同じ種の植物である請求項7または8の選抜方法。

**【請求項 10】**

場合により工程(5)でゲノムDNA断片を導入する植物が、工程(2)で形質転換された植物と異なる種の植物である請求項7または8の選抜方法。

**【請求項 11】**

場合により工程(5)でゲノムDNA断片を導入する植物が、工程(2)で形質転換された植

物と同じ栽培条件下で栽培される請求項9または10の選抜方法。

**【請求項12】**

場合により工程(5)でゲノムDNA断片を導入する植物が、工程(2)で形質転換された植物と異なる栽培条件下で栽培される請求項9または10の選抜方法。

**【請求項13】**

請求項1～12のいずれか1項の方法により選抜されたゲノムDNA断片を含むクローニングベクターを含む大腸菌を培養する工程および、大腸菌中で増幅したゲノムDNA断片を含むクローニングベクターを調製する工程を含むことを特徴とする、植物に農業上有益となりうる変異をもたらすことができるゲノムDNA断片の製造方法。

**【請求項14】**

請求項1～12のいずれか1項の方法によって選抜されたゲノムDNA断片を鋳型として、生化学的増殖法による増殖を行うことを特徴とするゲノムDNA断片の製造方法。

**【請求項15】**

請求項13または14の方法によって製造されたゲノムDNA断片を制限分解する工程を含むDNA断片の製造方法。

**【請求項16】**

請求項13～15のいずれか1項の方法により製造されたDNA断片。

**【請求項17】**

請求項1～16のいずれか1項の方法により選抜または製造されたゲノムDNA断片を含むクローニングベクターを含む大腸菌を培養する工程および、大腸菌中で増幅したゲノムDNA断片を含むクローニングベクターを調製する工程を含むことを特徴とする方法で製造した、農業上有益となりうる変異をもたらすことができるゲノムDNA断片を、植物に導入する工程を含む、農業上有益となりうる変異を有する植物の製造方法。

**【請求項18】**

農業上有益となりうる変異をもたらすことができるゲノムDNA断片を、植物に導入する工程が、植物細胞もしくは組織へのゲノム断片の導入、該植物細胞のカルス化、該カルスからの植物体への再生、再生した植物の栽培、の各工程を含む、請求項17の農業上有益となりうる変異を有する植物の製造方法。

**【請求項19】**

植物細胞もしくは組織へのゲノムDNA断片の導入が、生物的導入法、物理的導入法、化学的導入法からなる群から選択される方法により行われる、請求項18の植物の製造方法。

**【請求項20】**

農業上有益となりうる変異をもたらすことができるゲノムDNA断片を導入する植物が、該ゲノムDNA断片が由来する植物と同じ種の植物である、請求項17～19のいずれか1項の植物の製造方法。

**【請求項21】**

農業上有益となりうる変異をもたらすことができるゲノムDNA断片を導入する植物が、該ゲノムDNA断片が由来する植物と異なる種の植物である、請求項17～19のいずれか1項の植物の製造方法。

**【請求項22】**

請求項17～21のいずれか1項の方法により製造した植物。

**【請求項23】**

請求項1～12のいずれか1項の方法により選抜されたゲノムDNA断片を含むクローニングベクターを含む大腸菌を培養する工程および、大腸菌中で増幅したゲノムDNA断片を含むクローニングベクターを調製し、クローニングベクター中の植物ゲノムDNA断片のヌクレオチド配列を解読する工程を含むことを特徴とする、植物に農業上有益となりうる変異をもたらすことができるゲノムDNA断片の分析方法。

**【請求項24】**

請求項1～12のいずれか1項の方法によって選抜されたゲノムDNA断片を制限分解す

る工程を含むDNA断片の分析方法。

【請求項25】

請求項1～12のいずれか1項の方法によって選抜されたゲノムDNA断片を鋳型として、生化学的増殖法による増殖を行うことを特徴とするDNA断片の分析方法。

【請求項26】

分析が、ゲノムDNA断片の制限分解産物または生化学的増殖法による増殖産物のヌクレオチド配列を解読する工程を含む、請求項24または25の分析方法。

【請求項27】

請求項1～12のいずれか1項の方法によって選抜されたゲノムDNA断片を、植物の品種改良におけるマーカーとして使用する方法。

【請求項28】

請求項1～12のいずれか1項の方法によって選抜されたゲノムDNA断片をマーカーとし、該マーカーをゲノムDNA中に有する植物個体は品種改良に適すると判断し、該マーカーを有しない植物個体は品種改良に不適であると判断することからなる、請求項27の方法。

【請求項29】

請求項1～12のいずれか1項の方法によって選抜されたゲノムDNA断片を有することが知られている植物と、品種改良をすべき植物とを掛け合わせて得られた、後代植物個体からゲノムDNAを調製し、前記ゲノムDNA断片を有する後代植物個体を、品種改良のさらなる工程に使用できることからなる、請求項28の方法。

【請求項30】

請求項1～12のいずれか1項の方法によって選抜されたゲノムDNA断片を有することが知られている植物が、請求項22の植物である、請求項29の方法。

**【書類名】明細書**

**【発明の名称】ゲノムDNA断片の選抜方法**

**【技術分野】**

**【0001】**

本発明は、植物に農業上有益となりうる変異をもたらすことができるゲノムDNA断片を効率良く選抜する方法に関する。

**【背景技術】**

**【0002】**

農業上有益な新品種を育成するため、従来から、植物同士を交配させて後代を選抜する近交配育種法や、植物に突然変異を誘発させる突然変異育種法などが行われてきた。また近年では、バイオテクノロジーの進歩により、有用遺伝子を導入しその機能を発現させる遺伝子組換え植物も育成されている。

**【0003】**

**個別遺伝子導入による新品種育成**

通常、遺伝子組換えにより新品種を育成するためには、まず遺伝子を単離し、その機能を解析する必要がある。植物遺伝子についての分子生物学的知見は、近年飛躍的に増大し数多く、多くの種のゲノムDNA配列が決定され、部分長鎖および全長鎖cDNAクローンも多数单離され、その配列も決定されている。但し、これまでにクローン化され、推定されている遺伝子機能の多くは、単に、遺伝子のコード領域の塩基配列またはそれから推定される蛋白質のアミノ酸配列が、従来発見されている酵素遺伝子などの配列と類似であるとの情報に基づいており、遺伝子の機能を検証するには、形質転換体において遺伝子の発現と表現型とが一致することを確認しなければならない。そのため、個々の遺伝子の機能解明には大変な時間と労力が必要となり、その解明はほとんど進んでいない。

**【0004】**

全長鎖cDNAクローンを単離し、これを適当なプロモーター、ターミネーターと連結し、形質転換することにより、遺伝子の機能を検証しようとする試みがある。またこれを進め、完全長cDNAのライブラリーを植物に導入して、遺伝子機能を網羅的に解析する技術も開発されている(WO 03/018808 A)。しかし、これらにおいては、その遺伝子が本来持つプロモーターでなく、さらにイントロンその他の遺伝子発現制御機能も除かれてしまっているので、遺伝子本来の機能を発現することは期待しにくい。また、遺伝子によっては、そのスプライシングの方法が一通りではないために(Jordan et al. Trends in Plant Sciences 17:392-398, 2002)、cDNAクローンから本来の機能が失われている場合もある。実際、形質転換植物に認められる変異は、その多くが奇形であり、新品種育成の実用性には乏しい。

**【0005】**

近年ではバイオインフォマティクスの手法を利用し、各遺伝子のタンパク質に翻訳されるコーディング領域、プロモーター領域、イントロン領域などの推定も行われている。DNA断片を用いたマイクロアレイ技術により、遺伝子の発現様式が調査されている。遺伝子ノックアウト技術により、機能欠失変異体が数多く作製されており、遺伝子機能解析に使われている。また、アクチベーションタギングにより、遺伝子発現を高進した形質変換体が作製され、遺伝子機能解析に使われている。遺伝子によりコードされるタンパク質相互間の関係を明らかにするために、トゥーハイブリッドシステムが用いられている。

**【0006】**

しかし、バイオインフォマティクスによる遺伝子機能の推定では、既知のタンパク質の機能や構造と、それをコードする遺伝子の配列との関係から得られた知見を、機能不明の遺伝子の機能探索に利用する場合が多いが、最近の研究によって、cDNAの中には、タンパク質に翻訳されないものが多く存在すること、すなわち、mRNA様のRNAが転写はされるもののタンパク質は生成されない遺伝子が、多く存在することが明らかとなった。また、転写後、低分子のRNAとして機能する遺伝子も多い。したがって、これまでのバイオインフォマティクスの技術では、機能解明が困難なゲノムDNA上の遺伝子も多い。そのため

、このような最新の手法を駆使しても、遺伝子機能の推定は容易ではない。

#### 【0007】

上記のように遺伝子機能の解析は現在でも容易ではない。そして、たとえ遺伝子機能が特定できたとしても、このような個別遺伝子の形質転換を行う方法では、いわゆるヘテロシスにおいて発現の向上が認められる形質や量的形質を向上させた新品種を育成することは困難である。

#### 【0008】

##### ヘテロシス

ヘテロシス（雑種強勢）とは、2つの親品種を交雑したときに、雑種第一代（F1）が両親より強い生活力を示す現象をいう。ヘテロシスにおいては、植物体全体のビガー（vigor）が高い、植物体および器官が大きい、収量が高い、生長速度が速い、病害・虫害に強い、乾燥・高温・低温等さまざまな環境ストレスに対して強い、特定成分の増・減、特定酵素活性の増・減等々、さまざまな形質の向上が認められるが、これらの形質には農業上極めて有益なものが多い。ヘテロシスを用いた育種法として、異なる親を掛け合わせて新品種を作出する一代雑種育種法が古くから栽培植物の改良に利用されており、トウモロコシを始め、多くの作物において優良品種育成に大きな貢献をしてきた。しかし一代雑種育種法は、育種集団の育成・改良、自殖系統の育成、一般組合せ能力検定、特定組合せ能力検定、F1品種の選出等々の、多数のステップを必要とし、さらに、それぞれのステップには多大な時間と労力が必要となる。また、ヘテロシスは遺伝的に遠縁の親同士の掛け合わせで大きな効果が認められることが多いが、その反面、類縁関係が遠い場合、交配しても稔性をもたないことも多く、交配を行うことができる種の範囲は限られたものであった。

#### 【0009】

ヘテロシスを起こす分子機構は未だ解明されていない。最近の育種学の教科書においても、「生理学的、生化学的および分子レベルでの（ヘテロシス）の原因因子は、今日でも1952年に開かれたヘテロシス会議の当時と同じく、殆ど知られていない」（*Genetics and Exploitation of Heterosis in Crops*, p.173, ed. Coors and Pandey, 1999, American Society of Agronomy, Inc. and Crop Science Society of America, Inc., Madison, WI, U. S. A.)と記載されている。

#### 【0010】

最近、トウモロコシに関してヘテロシスに関連する興味深い報告がなされた。Fu and Donner, Proc. Natl Acad Sci USA 99:9573-9578, 2002とSong and Messing, Proc Natl Acad Sci USA 100:9055-9060, 2003である。両報とも、トウモロコシの特定の遺伝子座に着目して品種間の塩基配列の差異を調査し、その結果トウモロコシにおいては、品種間差異が、イネなどの自殖性作物の場合と比べ相当に大きいことが示された。

#### 【0011】

これらの知見は、ヘテロシスの現れやすい他殖性のトウモロコシでは、自殖性の作物よりも、品種間のゲノムDNAの配列の差異が大きいことを示す興味深いものであるが、ヘテロシスを起す分子機構が解明されたといえるものではない。

#### 【0012】

このようにヘテロシスを起こす分子レベルでの機構については未だ解明されていない。しかし、マクロなレベルでは、以下に示すような各種の遺伝子の相互作用により、ヘテロシスが起こることが明らかになってきている。

#### 【0013】

##### イ) 優性遺伝子連鎖効果(dominance effect)

ヘテロシスの認められる形質は、種々の連鎖群にある多くの遺伝子座に支配され、各遺伝子座において、生存や生産力に有利な対立遺伝子(allele)は優性で、不利な対立遺伝子は劣性である場合が多いと考えられる。連鎖している遺伝子座が多いため、多数の遺伝子座のすべてにおいて、有利な対立遺伝子がホモとなる系統を得ることは不可能に近い。しかし、F1においては、両親の持つすべての有利な対立遺伝子を合わせもつことができるため、ヘテロシスが引き起こされる。

**【0014】**

口) 超優性効果(over-dominance effect)  
 多数の遺伝子座において、それぞれ2つの対立遺伝子がヘテロに存在する場合の方が、どちらかの対立遺伝子がホモに存在する場合よりも、生存や生産力に有利な場合があり、このような効果の総和によりヘテロシスがもたらされる。

**【0015】**

ハ) 非対立遺伝子相互作用(interaction of non-allelic genes)  
 生存や生産力に有利な形質が、F1雑種において、異なった遺伝子間の相乗的な効果としてもたらされる場合がある。このような性質を示す多数の遺伝子の効果の総和が、ヘテロシスをもたらす。

**【0016】**

二) 細胞質遺伝子の効果(interaction between nuclear genes and cytoplasmic genes)  
 ) 核遺伝子と細胞質遺伝子の相互作用により、F1雑種において、生存や生産力に有利な形質が発現する場合がある。

**【0017】**

これらの各種、複数の遺伝子の相互作用により、ヘテロシスが引き起こされると考えられている。Stuber (Plant Breeding Reviews 12:227-251, 1994)は、これらのそれぞれが実際に関与していることを示す多数の文献を紹介しており、ヘテロシスは、多数の遺伝因子によって支配されていることを強調している。また、Li and Yuan (Plant Breeding Reviews 17:15-158, 2000)も、上記のさまざまな効果の総和によってヘテロシスが起こると考えている。

**【0018】**

このようにヘテロシスは、多数の遺伝因子によって支配されているため、個別遺伝子の形質転換のみでは、ヘテロシスにおいて発現の向上が認められる形質を向上させた新品种を育成することは困難である。

**【0019】**量的形質

ヘテロシスにより発現の向上が認められる形質は、いわゆる量的形質であることが多い。これを支配する量的形質遺伝子座(QTL, Quantitative Trait Loci)については、それが、これを支配する量的形質遺伝子座(QTL, Quantitative Trait Loci)については、その遺伝解析は簡単ではない。しかし、近年の分子生物学的手法の発展とともに、DNAマーカーを用いてQTLの遺伝解析を行うことが可能となってきた。実際、ある量的形質を支配するQTLを含む染色体部位が特定された例もある。さらに遺伝子地図を利用し、分子生物学的手法により、農業上有用な遺伝子をクローニングする研究も盛んになっている。

**【0020】**

一部の生物では、染色体上に多くの分子マーカーが同定され、マーカーの連鎖分析に基づいた遺伝子地図が作成されている。また、長大なゲノムDNAを連結することにより、物理的な位置関係も明らかになっている。

**【0021】**

遺伝子地図が作成されている生物では、特定の表現型をしめす形質とマーカーとの連鎖分析、および、それに続く染色体歩行などにより、その形質を支配する遺伝子の物理的位置を明らかにし、遺伝子を単離する試みが行われている。実際、この手法(マップベースクローニング)により、いくつかの遺伝子が単離されている。

**【0022】**

しかし、通常のQTL解析では、QTLを含む部位の同定は大まかにしかできず、理論的に多数の遺伝子を含むDNA断片が、QTLを含むDNA断片として明らかになるに過ぎない。そしてクローニング可能な大きさの断片、あるいは、形質転換により植物に導入することが可能な大きさの断片として同定することは容易ではない。また、詳細な遺伝子地図を作成して地図情報をもとに求める遺伝子を特定し、遺伝子をクローニングする作業には、長い時間と多くの労力が必要となる。実際に、QTL解析をもとに、量的形質を増大させるDNA断片が

クローニングされた例はほとんどない。

**【0023】  
ゲノムDNAライプラリー作出と、ゲノム断片による形質転換技術**

植物由来のゲノム断片のライプラリーを構築する技術は公知である。その際に形質転換可能なベクターを用いることも公知である。植物由来の個々の特定のクローンとしてのゲノム断片を、高等植物に導入する実験も試みられてきた。しかし、ゲノムDNAライプラリーを構成する、機能が未知の、多数のゲノム断片を個別に植物に導入する試みはこれまでになされていない。

**【0024】**  
また、ゲノムクローンを利用した場合に、cDNAを利用する場合と比べ遺伝子の発現効率が良くなる場合があることも知られている。実際、ある遺伝子（トウモロコシのホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼPhosphoenolpyruvate carboxylase）を含むゲノム断片を、植物（イネ）に導入したところ、極めて高いレベルで外来遺伝子の発現が認められたことも報告されている (Ku et al. Nature Biotechnol. 17:76-80, 1999)。また、40 - 80 kbのアラビドプシス由来のゲノムクローン3個を、個別にアラビドプシスに導入した実験例が報告されている (Liu et al. Proc Natl Acad Sci USA 96:6535-6540, 1999, Shibata and Liu Trends in Plant Sci 5:354-357, 2000)。うち2個のクローンは、これら2つのクローンに含まれている遺伝子座に突然変異を起こし重力屈性を失ったアラビドプシスの系統に導入され、欠失していた重力屈性が相補されることが確認されている。

**【0025】**  
上記の知見は、生物の遺伝子、とりわけ、多細胞生物の遺伝子は、時間的、空間的な分布、および、外的刺激などの環境条件により、その発現量が複雑な制御を受けていること、即ち、何時、どの組織、細胞で、どんな時に、どの程度の発現をするかが、その遺伝子の重要性を決定していることを示唆する。即ち、これらの高度な遺伝子制御を含んだ機能を解明するためには、その遺伝子のゲノム断片に含まれている、プロモーター、イントロン、エンハンサー、構造遺伝子、スプライシング部位、その他の高度な遺伝子発現制御機能のすべてを明らかにしなければならない。しかし、この作業には多大な労力と時間が必要であり、多くの遺伝因子の相互作用を解明するのは困難である。

**【0026】**

【特許文献1】PCT国際公開WO 03/018808 A

【非特許文献1】Jordan et al. Trends in Plant Sciences 17:392-398, 2002

【非特許文献2】Genetics and Exploitation of Heterosis in Crops, p.173, ed. Coors and Pandey, 1999, American Society of Agronomy, Inc. and Crop Science Society of America, Inc., Madison, WI, U. S. A.

【非特許文献3】Fu and Dooner, Proc. Natl Acad Sci USA 99:9573-9578, 2002

【非特許文献4】Song and Messing, Proc Natl Acad Sci USA 100:9055-9060, 2003

【非特許文献5】Stuber, Plant Breeding Reviews 12:227-251, 1994

【非特許文献6】Li and Yuan, Plant Breeding Reviews 17:15-158, 2000

【非特許文献7】Ku et al. Nature Biotechnol. 17:76-80, 1999

【非特許文献8】Liu et al. Proc Natl Acad Sci USA 96:6535-6540, 1999

【非特許文献9】Shibata and Liu Trends in Plant Sci 5:354-357, 2000

**【発明の開示】**

**【発明が解決しようとする課題】**

**【0027】**

本発明は、農業上有益な変異をもたらすことのできる、多数のゲノムDNA断片を効率良く選抜し、クローニングされたDNA断片として選抜し、調製する方法を提供する。

本発明は、複数の遺伝因子により発現が向上する形質について、その発現を向上させるゲノムDNA断片を効率良く選抜、調製する方法を提供する。

**【0028】**

本発明は、ヘテロシスにおいて発現が認められる形質や量的形質を向上させることでの

きる、多数のゲノムDNA断片を効率良く選抜し、クローン化されたDNA断片として選抜し、調製する方法を提供する。

#### 【0029】

本発明は、一代雜種育種法などの手法で避けることができない、育種集団の育成・改良、自殖系統の育成、一般組合せ能力検定、特定組合せ能力検定、F1品種の選出等々の、各々が長期の時間を要する多数のステップを必要とせずに、植物に農業上有益となりうる変異をもたらすことができるゲノムDNA断片を効率良く選抜、調製する方法を提供する。

#### 【0030】

本発明は、形質発現の機構や、形質を発現させる個々の遺伝子に関する情報がほとんどない場合でも、表現型のみに基づいて優良個体を選抜して、植物に農業上有益となりうる変異をもたらすことができるゲノムDNA断片を効率良く選抜、調製する方法を提供する。

#### 【0031】

本発明は、同種の植物品種間のみならず異種の植物品種間でも、ヘテロシスで見られる形質向上と同様の発現（以下「ヘテロシス様発現」という。）を可能にするゲノムDNA断片を効率良く選抜、調製する方法を提供する。

#### 【0032】

本発明は、多大な時間と人手を要することなく、ヘテロシス様発現を可能にする多数のゲノムDNA断片を短期間に効率よく選抜、調製する方法を提供する。

本発明は、本発明の方法で調製した、植物に農業上有益となりうる変異をもたらすことできるゲノムDNA断片もしくはヘテロシス様発現を引き起こすことができるゲノムDNA断片で植物を形質転換することにより、農業上有益となりうる変異を有する植物を製造する方法、並びに該方法で製造した植物を提供する。

#### 【0033】

本発明は、本発明の方法で調製した、植物に農業上有益となりうる変異をもたらすことができるゲノムDNA断片もしくはヘテロシス様発現を引き起こすことができるゲノムDNA断片の全部またはその一部をマーカーとして使用し、農業上有益となりうる変異を有する植物を育成する方法、並びに該方法で育成した植物を提供する。

#### 【用語の説明】

##### 【0034】

本明細書において、「農業上有益な変異」とは、「植物にとって通常もしくは良好な栽培条件または植物に何らかのストレスのかかる条件下で、植物、特に栽培植物および／または観賞用植物において、植物体の少なくとも一部について、量的な増大または減少、または観賞用植物において、植物体の少なくとも一部について、量的な増大または減少、または、その生長速度の増大または減少をもたらす変異」である。ストレスのかかる条件とは、栽培地の塩濃度、高温、低温、乾燥、病害等を含む。

##### 【0035】

このような変異は、通常の栽培条件下で、子実・茎葉等が増大すれば、多収という形質になるし、病害ストレス等がおよぶ条件下で枯死せず、対照と比して子実・茎葉等が増大すれば、病害ストレス等に対する抵抗性を意味するからである。内容成分や、植物体について、病害ストレス等も、当然、「植物体の一部」に含まれる。植物体の全体または部分のに含まれる酵素等も、当然、「植物体の一部」に含まれる。植物体の全体または部分のサイズの減少も、矮性植物の育種が盛んに行われ、広く栽培されていることから、農業上有益である場合がしばしばある。

##### 【0036】

よって、「何らかの栽培条件下で、植物体の少なくとも一部について、量的な増大または減少、または、その生長速度の増をもたらす変異」という概念は、植物体全体のビガーバイゴー（vigor）が高い、植物体および器官が大きい、収量が高い、生長速度が速い、病害・虫害に強い、乾燥・高温・低温等さまざまな環境ストレスに対して強い、特定成分の増・減、特定酵素活性の増・減、矮性化、等々、農業上有益な多くの変異を包含する。

##### 【0037】

###### [課題を解決するための手段]

本発明は、以下の(1)ないし(4)および所望により(5)の工程により、植物に農業上有

益となりうる変異をもたらすことができる、ゲノムDNA断片を選抜する方法である。  
(1) まず、植物から、通常用いられている方法によりゲノムDNA断片を単離し、部分的に制限分解を行い、サイズ分画の後、常法によりゲノムDNAライブラリーを構築する。

[0038]

【0038】  
ゲノムDNA断片を供与する植物には特別の制限はないが、好ましい例として、ゲノムDNA断片の導入先植物との交配によって、ヘテロシスが生じうる植物があげられる。例えばA断片の導入先植物がジャポニカイネである場合は、野生イネの一種であるオリザ・ルフィイポ、導入先の植物がジャポニカイネである場合は、野生イネの一種であるオリザ・ルフィイポゴンや、インディカイネが好ましい。導入先の植物がトウモロコシの特定品種である場合は、トウモロコシの他の品種や、野生種のテオシントなどが好ましい供与元植物の例である。一般的に、類縁関係の遠い植物ほど大きなヘテロシスが観察されている。従来は類縁関係が遠い場合には、交配が不可能となるため、類縁関係の遠い植物との組合せによるヘテロシスを利用できなかったのに対し、本発明の方法では、交配ができない供与元植物のゲノムDNA断片を容易に利用できるので、類縁関係の遠い植物も好ましい供与元植物として利用可能である。

[0039]

【0039】 ゲノムライブラリーの構築に用いるクローニングベクターとしては、種々のベクターが利用できる。好ましくは、直接、導入先の植物の形質転換に用いることのできるベクターが用いられる。例えば、イネ、タバコ、アラビドプシス等を形質転換するためにはpSB200が用いられる。pCLD04541 (Tao and Zhang Nucleic Acid Res 26:4901-4909, 1998) が使用でき、トウモロコシを形質転換するためにはpSB25UNpHmが使用できる。

[0 0 4 0]

【0040】 クローニングするDNA断片は、ゲノム中に存在する個々の遺伝子とその発現制御に必要な領域が内包できるよう、少なくとも1 kb以上であり、10 kb以上の大きさが好ましく、さらに好ましくは20 kb以上、さらに好ましくは30~40 kb以上である。いずれにせよ、DNA断片の大きさにはクローニングベクターに導入できる限り特別の上限はない。このようなDNA断片サイズを得るための部分的制限分解の方法は公知である。ゲノムDNAライブラリーを構成するクローンの総数、すなわち、ライブラリーのサイズは、植物ゲノムの多くの遺伝子が含まれるよう充分に大きいことが好ましい。部分的制限分解に用いる酵素としては、さまざまなものを用いることができる。より偏りの少ない分解を行うためには、4塩基認識の制限酵素、例えば、MboI、TaqIなどの使用が望ましい。適当な分解条件を決定する方法は公知であり、例えば、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001. に詳細な記載がある。

[0 0 4 1]

理論的には、任意のゲノム断片が当該ゲノムDNAライブラリーにある確率で呑まれるための、クローンの総数は下記の式により計算される。

$$N = \ln(1-P) / \ln(1-f)$$

(式中、

は、任意のゲノム断片が当該ゲノムDNAライブラリーに含まれる確率であり、

は、注意する。これは、クローンに含まれるゲノム断片の平均長／元の植物のゲノムサイズであり、

主は、クローランに呑まれたノンム部片  
等（つまりクローランの総数である）。

は、ケノム  
[2213]

【0042】 例えば、イネ由来のゲノムDNAライブラリーの場合、任意のゲノム断片が当該ゲノムDNAライブラリーに含まれる確率を70%、ゲノムDNAライブラリーの平均断片長を40 kbとするとき、

$$N = \ln(1 - 0.7) / \ln[1 - (40 \times 10^3 / 430 \times 10^6)] = 1.3 \times 10^4$$

ヒカリ1万3千個のクローンが必要となる。

〔0043〕

個々のクローンに含まれるゲノム断片サイズが大きい場合には、より少数のゲノム断片を調査すれば、求めるゲノム断片を獲得することができる。一方、ゲノム断片サイズが

小さい場合には、その後のクローニング操作等の取扱が容易になり、また、形質転換によって植物に導入する効率も高くなる。扱う植物のゲノムサイズ、実験の規模等の要因は総合的に検討して、決定される。

#### 【0044】

ゲノムサイズの大きな植物を取り扱う場合には、メチル化されたDNA断片を排除することによって、発現する遺伝子の内包されるDNA断片の頻度を向上させる手法の利用も有用である。ゲノムサイズの大きな植物には、遺伝子としては機能しない不要なDNAが多く含まれていると考えられており、そのようなDNAはメチル化されていることが多いと言われている。メチル化されているDNAを生化学的に除去する方法は公知であるし、クローニングの際に、メチル化されたDNAを除去する性質を持った大腸菌を用いることによっても、メチル化されたDNAの除去が可能である (WO 00/50587)。

#### 【0045】

ゲノムDNAライブラリーの構築後、ライブラリーを構成するクローンの一部を、大腸菌に取り込ませて培養する。出現するコロニー数（プラスミドまたはコスミドベクターの場合）やplaques数（ファージベクターの場合）を計数し、これを元に、ライブラリーに含まれるクローンの総数を見積もる。さらに、出現したコロニーやファージの一部から、DN Aを調製し、クローン化されたDNA断片の大きさを計測し、平均の断片長を見積もる。

#### 【0046】

(2) ライブラリーを構成する個々のクローンに含まれるゲノム由来のDNAを、個別に植物に導入する。

直接、植物の形質転換に用いることのできるベクター、例えばpSB200、pCLD04541、pSB25UNpHm等のベクターを用いた場合には、個々のクローンをそのまま、形質転換実験に用いることができる。そうでない場合には、個々のクローンに含まれるDNA断片の全部または一部を、形質転換用ベクターに移す操作を行った後、形質転換実験を行うことができる。

◦

#### 【0047】

形質転換に用いる導入先植物は、ゲノムDNAの由来する植物とは異種の植物であってもよく、同種の異なる品種であってもよく、同種の同一の品種であってもよい。好ましい植物の例として、イネ、大麦、小麦、トウモロコシなどの穀物、コーヒー、ココア、茶、タバコ、等の嗜好品を製造するための植物、野菜類、果物類、花などの観賞用植物、など実質上制限無く広い範囲の植物があげられる。

#### 【0048】

形質転換の方法は、既存のどのような方法であってもよい。例えば、生物的導入法としてアグロバクテリウム法などが、物理的導入法としてマイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法、シリコンカーバイド法、エアーインジェクション法などが、化学的導入法としてポリエチレングリコール法などが知られている。形質転換によりゲノムDNAは導入先植物のゲノムに組み込まれる。

#### 【0049】

本発明によれば、一つの植物ゲノムライブラリーから得られる、ヘテロジス様発現を引き起しうるゲノムDNA断片は、一つに限られないことが分かった。そこで、より多くのゲノム断片を選抜するためには、より多くのゲノム断片を、個別に植物に導入することが望ましい。また、本発明の選抜方法では、何らかの予備的な選抜工程を含めることを妨げないが、選抜される候補断片の偏りを排するためには、植物へ導入するゲノムDNA断片は、該導入以前に、できるかぎり予備的な選抜工程を含めないことが望ましい。

#### 【0050】

また、植物に導入する各ゲノムクローンについては、その少なくとも一部を増幅および／または保管しておく。保管は通常の方法により行ってよく、純化されたDNA、または、ゲノムクローンを含む大腸菌等の細菌、酵母等として保管される。

#### 【0051】

(3) ゲノム断片が導入された形質転換植物は、完全な植物体に再生し、栽培する。

再生された形質転換植物、および、その子孫の植物は、植物体全体のビガー(vigor)、植物体および個別器官の大きさ・重量、収量、生長速度、病害・虫害に対する抵抗性、乾燥・高温・低温等さまざまな環境ストレスに対する抵抗性、特定成分の増・減、特定酵素活性の増・減、等々、農業上有益なさまざまな形質について評価する。なお、ビガー(vigor)とは、植物体全体の活力や旺盛な生長力のことと言う。

#### 【0052】

評価試験の結果、評価した形質について、当該ゲノム断片を導入しなかった植物と比較して、表現型が変異した植物を選抜する。例えば、当該ゲノム断片を導入しなかった植物と比較して、植物体全体のビガー(vigor)が高い、植物体および個別器官の大きく、重量が高い、収量が高い、生長速度が高い、病害・虫害に対する抵抗性が高い、乾燥・高温・低温等さまざまな環境ストレスに対する抵抗性が高い、特定成分の増・減、特定酵素活性の増・減、等々を示す植物を選抜することができる。各形質について、選抜すべき変異の方向は、一方とはかぎらない。例えば、矮性という形質は、いろいろな作物において育種目標となる重要な農業形質であるので、植物体および個別器官の大きさについては、当該ゲノム断片を導入しなかった植物と比較してより小さくなつた植物も選抜することができる。他の形質についても同様である。

#### 【0053】

選抜された植物については、子孫の植物の評価、さらにさまざまな形質に関する反復調査などを行い、変異の認められた形質の特性、遺伝様式、他の形質等との関連を評価することができる。様々な評価の後、新規な品種として農業的に利用することもできる。また、これらの植物のなかから、さらに優れた形質を示す植物が得られれば、このような植物に導入されていたゲノムDNA断片を、さらに価値の高いゲノムDNA断片として選抜することができる。

その際、導入されていたゲノムDNA断片の解析および取得は、通常のクローニングの方法により容易に行うことができる。

#### 【0054】

(4) 選抜された植物に導入されたゲノムDNA断片は、前記のとおりゲノムクローンとして別途保管されており、クローニングベクターを用いて大腸菌で増殖する方法や、PCR法やLAMP法などの生化学的増殖法を用いて、必要量を製造することができる。そしてこれらを用いて、塩基配列の決定、含まれている遺伝子、イントロンその他の遺伝子要素の分析等を詳細に調査することができる。このゲノム断片は、既知の形質転換手法を用いて、任意の植物に導入することができるので、ゲノムDNA断片が由来する植物とは異種の植物の品種改良、同種の植物の異なる品種の品種改良、同種の植物の同一品種の植物の育種に利用することができる。

#### 【0055】

(5) このように選抜されたゲノムDNA断片は、必要であれば、その全部または一部を、再度、同種または異種の植物に導入し、同様な評価を行うことにより、2次的な選抜工程に供することができる。この場合、工程(2)で用いたものと同一のクローニングベクターを用いて形質転換を行ってもよいし、別のクローニングベクターを用いてもよい。別のクローニングベクターを用いる場合には、工程(4)で選抜されたゲノムDNA断片をそのベクターにサブクローニングすることになる。クローニングベクター中のクローニングに用いる制限部位はクローニングベクターにより異なるので、用いる制限酵素によっては、工程(4)で選抜されたゲノムDNA断片の一部のみをサブクローニングするのが適当である場合がある。また、クローニングベクターまたはクローニングの方法によってクローニングできるDNA断片の大きさが異なるので、この理由によつても該DNA断片の一部のみをサブクローニングするのが適当である場合がある。該DNA断片の一部のみを用いて2次的な選抜工程を実施することの効果のひとつは、該DNA断片の一部のみを用いて形質転換を行つて、該DNA断片の全部を用いた場合と同様な効果を示すことが判明した場合には、工程(4)で選抜されたゲノムDNA断片中の不要部分が明らかになることである。2次的な形質転換によって得られた形質転換植物、および、その子孫の植物は、植物体全体のビガー(vigor)、

植物体および個別器官の大きさ・重量、収量、生長速度、病害・虫害に対する抵抗性、乾燥・高温・低温等さまざまな環境ストレスに対する抵抗性、特定成分の増・減、特定酵素活性の増・減、等々、農業上有益なさまざまな形質について評価する。

#### 【0056】

評価試験の結果、評価した形質について、当該ゲノム断片を導入しなかった植物と比較して、表現型が変異した植物を生じたゲノムDNA断片は、1次の選抜工程における栽培条件、植物種、等の条件にかかわらず好ましい表現型の変異を植物に生じることが可能であれば、特に好ましいゲノムDNA断片として選抜できる。2次以降の選抜工程においても1次り、全体のビガー(vigor)が高い、植物体および個別器官の大きさ、重量が高い、収量が高い、生長速度が高い、病害・虫害に対する抵抗性が高い、乾燥・高温・低温等さまざまな環境ストレスに対する抵抗性が高い、特定成分の増・減、特定酵素活性の増・減、等々を示す植物を選抜することができる。

#### 【0057】

選抜された植物については、子孫の植物の評価、さらにさまざまな形質に関する反復調査などを行い、変異の認められた形質の特性、遺伝様式、他の形質等との関連を評価することができる。様々な評価の後、新規な品種として農業的に利用することもできる。

#### 【0058】

2次選抜の結果、再度植物に導入しても農業上有益な変異をもたらすことができる事が確認されたゲノムDNA断片や、他の植物にも農業上有益な変異をもたらすことができる事が確認されたゲノムDNA断片が選抜されることになる。したがって、1次選抜のみの場合よりも、より価値の高いゲノムDNA断片が選抜されることになる。

#### 【0059】

この選抜工程は何度でも繰り返すことができ、その結果、より価値の高いゲノムDNA断片を選抜することができる。

選抜されたゲノムDNA断片に含まれる遺伝子の転写物や、それに由来するcDNAの解析、また、ゲノムDNA断片の塩基配列から推定される遺伝子の特性等を、詳細かつ総合的に解析することにより、このゲノムDNA断片に含まれる遺伝子機能の推定や、ヘテロシスを引き起こす機構の解明に有用な知見を得ることができる。

#### 【0060】

以上、ゲノムDNA断片の選抜方法を中心に、本発明を説明したが、本発明はこうして選抜された植物に農業上有益となりうる変異をもたらすことができるゲノムDNA断片、当ゲノムDNA断片での形質転換により生じた農業上有益となりうる変異を有する植物も提供する。特定のDNA断片を植物細胞または植物組織に導入し、該細胞または組織をカルス化し、該カルスを培養しさらに完全植物体に再分化させる方法は、既に種々の方法が知られており。例えば、Hiei et al. Plant J. 6:271-282, 1994を参照のこと。再分化した植物を品種として固定するためには、Maruta et al. Molecular Breeding 8:273-284, 2001の方法が知られている。

#### 【0061】

本発明はさらに、本発明のゲノムDNA断片を、植物の品種改良におけるマーカーとして使用する方法にも関する。すなわち、本発明のゲノムDNA断片を有する植物は、植物の品種改良の効率を高めるために使用できる。品種改良のための使用とは、本発明のゲノムDNA断片を他の植物に導入するための、ゲノムDNA断片供与用植物としての使用であってもよく、あるいは交配育種法により品種改良を行うための親植物としての使用であってもよい。例えば、本発明のゲノムDNA断片を有することが知られている植物と、品種改良をする。例えは、本発明のゲノムDNA断片を掛け合わせて得られた、後代植物個体からゲノムDNAを調製し、該ゲノムDNAべき植物とを掛け合わせて得られた、後代植物個体からゲノムDNAを調製し、該ゲノムDNA中に本発明のゲノムDNA断片が含まれているものを選択し、選択した後代植物個体を、特定のゲノムDNA断片の配列情報を用いて、該DNA断片をマーカーとすることは公知である。Euphytica 129:241-247, 2003等に記載されている。なお、マーカーとしての使用においては、ゲノムDNA断片全体をマーカーとしてもよく、該ゲノムDNA

断片の一部に特有の配列を含むなら、当該一部の配列をマーカーとしてもよい。

### 【0062】

#### [発明の効果]

本発明のゲノムDNA断片選抜方法は、従来のゲノム解析の中で塩基配列を既知の塩基配列と比較検討する方法や、cDNAの機能推定する方法のように植物の遺伝子の機能を解明することを必要としない、新しいアプローチでヘテロシスに関与するDNA断片を探索する。

### 【0063】

本発明のゲノムDNA断片選抜方法は、ヘテロシス同様の効果を引き起こすゲノムDNA断片を、クローニングされたDNA断片として、かつ、植物への形質転換を容易に行うことができることを可能にしたため、古典的な育種法によるヘテロシスの利用と異なり、育種に伴う長い時間と多くの労力を必要としない。

### 【0064】

また、本発明のゲノムDNA断片選抜方法は、古典的な育種法によるヘテロシスの利用と異なり、一方の品種のゲノム断片を他方の品種に導入するため、親品種間の生殖的隔離の制限を受けず、従来の一代雜種育種法では不可能だった植物同士の組み合わせが可能となる。従って、本発明のDNA断片は、DNA断片由来の植物と同種であるか異種であるかを問わず、さまざまな植物に形質転換法により容易に導入し、育種に利用することができる。短期間に、効率良くヘテロシスの利点を利用することができる。

### 【0065】

さらにまた、本発明のゲノムDNA断片選抜方法は、QTL解析と異なり、農業形質に関与する遺伝子座を探索する必要がないために、長い時間と多大な労力を要することなく、効率よく量的形質を増大または減少させるゲノムDNA断片を選抜することが可能である。

### 【0066】

また、本発明のゲノムDNA断片は、形質転換によりヘテロシス同様の発現を引き起こすため、通常の交配育種法においてマーカーとして利用することによって、交配効果があるため、後代の選抜効率を非常に高めることができる。

#### 【実施例】

### 【0067】

以下の実施例において、とくに明示しない限り、詳細な実験手順は、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc, (Supplements up to No. 59, July 2002, are included)、または、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001.に記載されている。

### 【0068】

実施例1. オリザ・ルフィポゴンからのゲノムDNAの抽出とゲノムDNAライプラリーの構築  
農林水産省生物資源研究所より入手した、イネの近縁種オリザ・ルフィポゴンの種子を用い、温室で栽培したオリザ・ルフィポゴンの葉から、常法によりゲノムDNAを抽出した。このゲノムDNAを制限酵素TaqIにより、部分的制限分解を行った後、ショ糖密度勾配遠心により、30 kbから50 kbの画分を調製した。この画分を用いて、コスミドベクターpSB200のNsp(7524)V（単にNspVと記す場合もある）切断部位にクローニングを行い、ゲノムDNAライプラリーを構築した。

### 【0069】

pSB200は、Komari et al. (Plant J. 10:165-174, 1996)に記載されたpSB11より構築したクローニングベクターである。すなわち、トウモロコシ由来のユビキチンプロモーターに、ハイグロマイシン耐性遺伝子と、NOS遺伝子の3'未シグナル、さらに、Nsp(7524)V切開部位をpSB11に付与したものである。pSB200を用いると、平均断片長約40 kb前後のゲノムDNAライプラリーを構築することができる。また、pSB200は、高等植物の形質転換用ベクターであり、ハイグロマイシン耐性遺伝子を選抜マーカーとしてさまざまな植物に遺伝子導入をすることができる。

### 【0070】

このライプラリーにおいてクローン化されたDNA断片の多くは、約30 kb から約50 kb の大きさであり、クローンの総数は、約8万個であった。なお、用いた大腸菌の菌株は、DH<sub>5</sub>α、およびGeneHogである。

**【0071】**  
実施例2. オリザ・ルフィポゴン由来のゲノムDNAライプラリーの構成クローンによるジャボニカイネの形質転換

上記ゲノムDNAライプラリーの構成クローンを、個別に、アグロバクテリウム菌株LBA4404(pSB1) (Komari et al. 1996) に導入した。導入に用いた方法は、Triparental mating (Ditta et al. Proc Natl Acad Sci. U.S.A. 77:7347-7351, 1980) である。これらのアグロバクテリウムを、個別に、イネ（品種ゆきひかり）に導入した。形質転換法は、Hiei et al. 1994に従い、未熟胚にアグロバクテリウムを接種する方法により行った。品種ゆきひかりの未熟胚は、食用に販売されている玄米を播種し温室で栽培した植物、または、温室で栽培したその子孫の植物より得た。

**【0072】**  
その結果、上記ゲノムDNAライプラリーに含まれる計5310個のゲノムDNA断片を、個別に導入した形質転換植物が得られた。また、それぞれのゲノムDNA断片について、1～5個導入した形質転換体を得た。本明細書では、常法にしたがい、形質転換された当該の植物の独立な形質転換体を得た。T0世代の植物とよび、その子孫の植物を、世代順にT1世代の植物、T2世代の植物等と呼ぶ。

**【0073】**  
ここで、この結果を先述した式にあてはめると、 $5310 = \ln(1-P)/\ln[1-(40 \times 10^3 / 430 \times 10^6)]$  より、P=0.39 となり、これら5310個のゲノムDNA断片に、任意のオリザ・ルフィポゴン由来のゲノムDNA断片が含まれる確率は39%である。

**【0074】**  
実施例3. オリザ・ルフィポゴン由来のゲノムDNAライプラリーに含まれるゲノムDNA断片によって形質転換されたジャボニカイネの評価と、変異の生じた植物の選抜

形質転換植物を温室で栽培し、それぞれの個体について、植物体全体のビガー、草丈、相対成長率、穂数、地上部重、穂重、穂長、可稔粒数、収量を調査した。その結果、オリザ・ルフィポゴン由来のゲノムDNAを導入していないゆきひかり（対照植物）と比較して、いずれかの形質について変異が認められた植物を選抜した。表1から6および図3に、選抜された植物の例と、導入されたゲノムDNA断片に付与した名称を示す。これらの例で、同一のゲノム断片が導入された形質転換体の中での複数のものが同様な変異を示し、各ゲノム断片について、選抜された植物の測定値の平均を示す。植物体全体選抜された。各ゲノム断片について、選抜された植物は、多くの場合、何らかの測定数値についてのビガーの外観観察に基づき選抜された植物は、多くの場合、何らかの測定数値にも変異が生じていた。下記の例は、いずれも、植物体全体のビガーと何らかの測定数値に基づいて、選抜が行われたものである。

**【0075】**  
下記の例では、対照植物の測定値の分布を正規分布にあてはめた。この正規分布にしたがい、導入遺伝子の効果がないと仮定した場合に、選抜された形質転換植物系統の測定値を示すような系統が出現する確率を算出した。いずれの場合も、被選抜系統数に対する、出現確率の数値は著しく小さく、このような選抜系統が出現する期待値は1.0を大きく下回る。したがって、導入遺伝子の効果がないとする仮定は棄却され、選抜系統が有意な変異を示すことが、統計的に証明される。

**【0076】**

【表1】

表1：  
移植後14日目の草丈と植物体全体のピガーに基づき選抜された形質転換植物の例と  
対照植物（世代：T0、被選抜系統数846）

区分	導入したゲノムDNA断片	調査個体数	測定値の平均(cm)	導入遺伝子の効果がないと仮定した場合にこのような系統が存在しうる確率	備考
選抜された形質転換植物	A029B04 (SEQ ID NO:1 SEQ ID NO:2)	5	38.8	0.000007	独立した形質転換植物の平均値
選抜された形質転換植物	A028C04 (SEQ ID NO:3 SEQ ID NO:4)	4	39.0	0.00003	
対照植物		311	28.2		標準偏差: 7.58

【0077】

【表2】

表2：  
移植後21日目の草丈と植物体全体のピガーに基づき選抜された形質転換植物の例と  
対照植物（世代：T0、被選抜系統数：931）

区分	導入したゲノムDNA断片	調査個体数	測定値の平均(cm)	導入遺伝子の効果がないと仮定した場合にこのような系統が存在しうる確率	備考
選抜された形質転換植物	A029B04 (SEQ ID NO:1 SEQ ID NO:2)	5	50.6	0.0003	独立した形質転換植物の平均値
選抜された形質転換植物	A028C04 (SEQ ID NO:3 SEQ ID NO:4)	4	52.0	0.0003	
選抜された形質転換植物	A048F12 (SEQ ID NO:5 SEQ ID NO:6)	5	51.8	0.0008	
対照植物		336	42.7		標準偏差: 8.58

【0078】

【表3】

表3：  
移植後14日目から21日目までの相対生長率と植物体全体のビガーに基づき選抜された形質転換植物の例と対照植物（世代：T0、被選抜系統数：841）

区分	導入したゲノムDNA断片	調査個体数	測定値の平均	導入遺伝子の効果がないと仮定した場合にこのような系統が存在しうる確率	備考
選抜された形質転換植物	A049A01 (SEQ ID NO:7 SEQ ID NO:8)	1	0.224	0.00002	独立した形質転換植物の平均値
選抜された形質転換植物	A046A06 (SEQ ID NO:9 SEQ ID NO:10)	3	0.136	0.00006	
選抜された形質転換植物	A045B09 (SEQ ID NO:11 SEQ ID NO:12)	3	0.141	0.00007	
対照植物		306	0.076		標準偏差:0.036

【0079】

【表4】

表4：  
成熟期の地上部重と植物体全体のビガーに基づき選抜された形質転換植物の例と対照植物（世代：T0、被選抜系統数：1464）

区分	導入したゲノムDNA断片	調査個体数	測定値の平均(g)	導入遺伝子の効果がないと仮定した場合にこのような系統が存在しうる確率	備考
選抜された形質転換植物	A049A07 (SEQ ID NO:13 SEQ ID NO:14)	5	6.24	0.0000005	独立した形質転換植物の平均値
選抜された形質転換植物	A040D06 (SEQ ID NO:15 SEQ ID NO:16)	5	6.40	0.0000002	
選抜された形質転換植物	A048F12 (SEQ ID NO:5 SEQ ID NO:6)	5	6.33	0.0000007	
対照植物		558	3.56		標準偏差:1.78

【0080】

【表5】

表5：

穂重と植物体全体のピガーに基づき選抜された形質転換植物の例と対照植物（世代：T0、被選抜系統数：1464）

区分	導入したゲノムDNA断片	調査個体数	測定値の平均(g)	導入遺伝子の効果がないと仮定した場合にこのような系統が存在しうる確率	備考
選抜された形質転換植物	A036A03 (SEQ ID NO:17 SEQ ID NO:18)	5	0.98	0.00005	独立した形質転換植物の平均値
選抜された形質転換植物	A051E08 (SEQ ID NO:19 SEQ ID NO:20)	3	1.17	0.00001	
選抜された形質転換植物	A023D09 (SEQ ID NO:21 SEQ ID NO:22)	2	1.31	0.00009	
対照植物		558	0.55		標準偏差:0.30

【0081】

【表6】

表6：

穂長と植物体全体のピガーに基づき選抜された形質転換植物の例と対照植物（世代：T0、被選抜系統数：1464）

区分	導入したゲノムDNA断片	調査個体数	測定値の平均(cm)	導入遺伝子の効果がないと仮定した場合にこのような系統が存在しうる確率	備考
選抜された形質転換植物	A030B02 (SEQ ID NO:23 SEQ ID NO:24)	5	14.4	0.00005	独立した形質転換植物の平均値
選抜された形質転換植物	A043F04 (SEQ ID NO:25 SEQ ID NO:26)	5	13.5	0.00005	
選抜された形質転換植物	A049E02 (SEQ ID NO:27 SEQ ID NO:28)	2	15.9	0.00009	
対照植物		557	12.3		標準偏差:1.85

【0082】

さらに形質転換植物の子孫の植物を栽培し、上記と同様に、植物の評価を行った。また、T1世代では、メンデルの法則にしたがって、導入したゲノム断片を含む個体と含まない個体が分離する事が予想されるので、導入遺伝子の有無について、Polymerase Chain Reaction (PCR) 法を用いて調査した。

【0083】

以下の表7から9に、選抜された植物の例と、導入されたゲノムDNA断片に付与した名称を示す。これらの例では、同一の形質転換植物に由来する複数の子孫植物において、PCR法により導入遺伝子の存在が確認された植物がすべて同様な変異を示し、PCR法により導入遺伝子が検出されなかった植物がすべてそのような変異を示さなかった。また、下記の例では、いずれも植物体全体のピガー、および、何らかの測定数値に基づいて、選抜が行われたものである。

## 【0084】

下記の例では、対照植物の測定値の分布を正規分布にあてはめた。この正規分布にしたがい、導入遺伝子の効果がないと仮定した場合に、選抜された形質転換植物系統の測定値を示すような系統が出現する確率を算出した。いずれの場合も、被選抜系統数に対する、出現確率の数値は著しく小さいため、このような選抜系統が出現する期待値は1.0を大きく下回る。したがって、導入遺伝子の効果がないとする仮定は棄却され、選抜系統が有意な変異を示すことが、統計的に証明される。

## 【0085】

【表7】

表7：  
移植後14日目の草丈と植物体全体のビガーベースに基づき選抜された形質転換植物の例と  
対照植物（世代：T1、被選抜系統数114）

区分	導入したゲノム DNA断片	調査個 体数	測定値 の平均 (cm)	導入遺伝子の効 果がないと仮定 した場合にこの ような系統が存 在しうる確率	備考
選抜された形質転換植物	A010C09 (SEQ ID NO:29 SEQ ID NO:30)	7	61.7	0.001	全個体PCR法によ り遺伝子導入確 認済み
選抜された形質転換植物	A011C02 (SEQ ID NO:31 SEQ ID NO:32)	7	62.5	0.0001	
選抜された形質転換植物	A010B03 (SEQ ID NO:33 SEQ ID NO:34)	5	60.4	0.002	
対照植物		84	58.5		標準偏差:3.5

## 【0086】

【表8】

表8：  
移植後21日目の草丈と植物体全体のピガーに基づき選抜された形質転換植物の例と  
対照植物（世代：T1、被選抜系統数114）

区分	導入したゲノムDNA断片	調査個体数	測定値の平均(cm)	導入遺伝子の効果がないと仮定した場合にこのような系統が存在しうる確率	備考
選抜された形質転換植物	A010C09 (SEQ ID NO:29 SEQ ID NO:30)	7	69.0	0.001	全個体PCR法により遺伝子導入確認済み
選抜された形質転換植物	A011C02 (SEQ ID NO:31 SEQ ID NO:32)	6	71.0	0.000008	
選抜された形質転換植物	A010B03 (SEQ ID NO:33 SEQ ID NO:34)	5	71.0	0.000006	
選抜された形質転換植物	A009F06 (SEQ ID NO:35 SEQ ID NO:36)	7	70.6	0.00003	
選抜された形質転換植物	A009E11 (SEQ ID NO:37 SEQ ID NO:38)	5	70.4	0.00003	
対照植物		84	66.1		標準偏差:3.4

【0087】

【表9】

表9：  
移植後14日目から21日目までの相対生長率と植物体全体のピガーに基づき選抜された形質転換植物の例と対照植物（世代：T1、被選抜系統数：114）

区分	導入したゲノムDNA断片	調査個体数	測定値の平均	導入遺伝子の効果がないと仮定した場合にこのような系統が存在しうる確率	備考
選抜された形質転換植物	A010B03 (SEQ ID NO:33 SEQ ID NO:34)	7	0.032	0.00002	全個体PCR法により遺伝子導入確認済み
選抜された形質転換植物	A008B02 (SEQ ID NO:39 SEQ ID NO:40)	7	0.024	0.002	
対照植物		84	0.018		標準偏差:0.007

【0088】

#### 実施例4. ストレス耐性評価等に基づく形質転換植物の選抜

実施例2において作出了した形質転換植物、および子孫の植物について、乾燥耐性、耐塩性、および耐病性の評価を行った。そして、オリザ・ルフィポゴン由来のゲノムDNAを導入していないゆきひかり（対照植物）と比較して、いずれかの形質について変異が認められた植物を選抜した。さらに、これらの植物に導入されたゲノムDNA断片を、イネに農業的に有益となりうる変異を起こすことのできるゲノムDNA断片として選抜した。

【0089】

#### 実施例5. オリザ・ルフィポゴン由来のゲノムDNAライブラリーの構成クローンによるト

ウモロコシの形質転換と、形質転換されたトウモロコシの評価

実施例1において作成した、オリザ・ルフィポゴン由来のゲノム断片を含むアグロバクテリウムを用いて、トウモロコシの形質転換を行った。形質転換の手法は、Ishida et al 2002 (Plat Biotechnol. 20:57-66) に従った。導入品種はインブレッド品種A188 (農林水産省生物資源研究所より入手) である。また、ベクターとしてpSB25UNpHmを用いて、実施例1と同様に、ゲノムライブラリー、およびオリザ・ルフィポゴン由来のゲノム断片を含むアグロバクテリウムを作成した。これを用いて、上記と同様にトウモロコシの形質転換を行った。pSB25UNpHmは、Ishida et al. Nature Biotech 14:745-750, 1996に記載されたpSB25のbar遺伝子のプロモーターを、トウモロコシ由来のユビキチンプロモーターに置き換え、さらに、Nsp(7524)V切断部位、I-SceI切断部位、I-CeuI切断部位を付与したベクターである。pSB25UNpHmは、pSB200と同様なクローニング能力があり、また、bar遺伝子を選抜マーカーとして、トウモロコシを始めとするさまざまな植物に遺伝子導入をすることができる。

## 【0090】

形質転換植物およびその子孫の植物は、イネの場合と同様に温室で栽培し、植物体全体のビガー、草丈、相対成長率、地上部重、穂重、穂長、可稔粒数、収量、乾燥耐性、耐塩性、および耐病性を調査することにより、導入したゲノム断片の効果を判定した。そして、これらの形質のうち、1つまたは複数の形質について、変異の生じた形質転換植物およびその子孫植物を選抜した。さらに、これらの植物に導入されたゲノムDNA断片を、トウモロコシに農業的に有益となりうる変異を起こすことのできるゲノムDNA断片として選抜した。

## 【0091】

実施例6. オリザ・ルフィポゴン由来のゲノムDNAライブラリーの構成クローンによるタバコの形質転換と、形質転換されたタバコの評価

実施例1において作成した、オリザ・ルフィポゴン由来のゲノム断片を含むアグロバクテリウムを用いて、タバコの形質転換を行った。形質転換の手法は、Komari Theor Appl Genet. 80:167-171, 1990に従った。導入品種はSR1 (Kodama et al. Plant Physiol 105:601-605, 1994) である。

## 【0092】

形質転換植物およびその子孫の植物は、イネ・トウモロコシの場合と同様に温室で栽培し、植物体全体のビガー、草丈、相対成長率、葉数、葉長、葉幅、葉重、地上部重、収量、乾燥耐性、耐塩性、および、耐病性を調査することにより、導入したゲノム断片の効果を判定した。そして、これらの形質のうち、1つまたは複数の形質について、変異の生じた形質転換植物およびその子孫植物を選抜した。さらに、これらの植物に導入されたゲノムDNA断片を、タバコに農業的に有益となりうる変異を起こすことのできるゲノムDNA断片として選抜した。

## 【0093】

実施例7. アラビドプシス由来のゲノムDNAライブラリーによる、イネ、トウモロコシ、および、タバコの形質転換と、形質転換植物の評価

オリザ・ルフィポゴンの場合と同様に、アラビドプシスからゲノムDNAを単離し、ゲノムDNAライブラリーを構築し、このゲノムDNAライブラリーを構成するゲノムクローンを個別に、形質転換法によりイネ、トウモロコシ、および、タバコに導入した。用いたアラビドプシスのエコタイプはColumbiaであり、この種子は、国際的なアラビドプシス遺伝資源バンク (例えば、RIKEN Bioresource Center) から入手することができる。形質転換植物およびその子孫の植物は、オリザ・ルフィポゴン由来のゲノムDNAライブラリーの場合と同様に、温室で栽培し、植物体全体の植物体全体のビガー、草丈、相対成長率、穂数、地上部重、穂重、穂長、可稔粒数、収量、葉数、葉長、葉幅、葉重、乾燥耐性、耐塩性、および、耐病性を調査することにより、導入したゲノム断片の効果を判定した。そして、これらの形質のうち、1つまたは複数の形質について、変異の生じた形質転換植物およびその子孫植物を選抜した。選抜された植物に導入したゲノム断片を、イネ、トウモロコシ、

またはタバコに、農業的に有益となりうる変異を起こすことのできる、アラビドプシス由来のゲノム断片として選抜した。

## 【0094】

実施例8. ローズグラス由来のゲノムDNAライプラリーによる、イネ、トウモロコシ、および、タバコの形質転換と、形質転換植物の評価

オリザ・ルフィポゴンの場合と同様に、ローズグラス (*Chloris gayana*) からゲノムDNAを単離し、ゲノムDNAライプラリーを構築し、このゲノムDNAライプラリーを構成するゲノムクローンを個別に、形質転換法によりイネ、トウモロコシ、および、タバコに導入した。用いたローズグラスの品種は、カリーデとして市販されているものである。形質転換植物およびその子孫の植物は、オリザ・ルフィポゴン由来のゲノムDNAライプラリーの場合と同様に、温室で栽培し、植物体全体の植物体全体のビガー、草丈、相対成長率、穂数合、地上部重、穂重、穂長、可稔粒数、収量、葉数、葉長、葉幅、葉重、乾燥耐性、耐塩性、および、耐病性を調査することにより、導入したゲノム断片の効果を判定した。そして、これらの形質のうち、1つまたは複数の形質について、変異の生じた形質転換植物およびその子孫植物を選抜した。選抜された植物に導入したゲノム断片を、イネ、トウモロコシ、または、タバコに、農業的に有益となりうる変異を起こすことのできる、ローズグラス由来のゲノム断片として選抜した。

## 【0095】

実施例9. ソルガム由来のゲノムDNAライプラリーによる、イネ、トウモロコシ、および、タバコの形質転換と、形質転換植物の評価

オリザ・ルフィポゴンの場合と同様に、ソルガム (*Sorghum bicolor*) からゲノムDNAを単離し、ゲノムDNAライプラリーを構築し、このゲノムDNAライプラリーを構成するゲノムクローンを個別に、形質転換法によりイネ、トウモロコシ、および、タバコに導入した。用いたソルガムの品種は、ゴールドソルゴーとして市販されているものである。形質転換植物およびその子孫の植物は、オリザ・ルフィポゴン由来のゲノムDNAライプラリーの場合と同様に、温室で栽培し、植物体全体の植物体全体のビガー、草丈、相対成長率、穂数、地上部重、穂重、穂長、可稔粒数、収量、葉数、葉長、葉幅、葉重、乾燥耐性、耐塩性、および、耐病性を調査することにより、導入したゲノム断片の効果を判定した。そして、これらの形質のうち、1つまたは複数の形質について、変異の生じた形質転換植物およびその子孫植物を選抜した。選抜された植物に導入したゲノム断片を、イネ、トウモロコシ、またはタバコに、農業的に有益となりうる変異を起こすことのできる、ソルガム由来のゲノム断片として選抜した。

## 【0096】

実施例10. テオシント由来のゲノムDNAライプラリーによる、イネ、トウモロコシ、および、タバコの形質転換と、形質転換植物の評価

オリザ・ルフィポゴンの場合と同様に、テオシント (*Zea diploperennis*) からゲノムDNAを単離し、ゲノムDNAライプラリーを構築し、このゲノムDNAライプラリーを構成するゲノムクローンを個別に、形質転換法によりイネ、トウモロコシ、および、タバコに導入した。用いたテオシントの品種は、牧草用テオシントとして市販されているものである。形質転換植物およびその子孫の植物は、オリザ・ルフィポゴン由来のゲノムDNAライプラリーの場合と同様に、温室で栽培し、植物体全体の植物体全体のビガー、草丈、相対成長率、穂数、地上部重、穂重、穂長、可稔粒数、収量、葉数、葉長、葉幅、葉重、乾燥耐性、耐塩性、および、耐病性を調査することにより、導入したゲノム断片の効果を判定した。そして、これらの形質のうち、1つまたは複数の形質について、変異の生じた形質転換植物およびその子孫植物を選抜した。選抜された植物に導入したゲノム断片を、イネ、トウモロコシ、または、タバコに、農業的に有益となりうる変異を起こすことのできる、テオシント由来のゲノム断片として選抜した。

## 【0097】

実施例11. スーダングラス由来のゲノムDNAライプラリーによる、イネ、トウモロコシ、および、タバコの形質転換と、形質転換植物の評価

オリザ・ルフィポゴンの場合と同様に、スーダングラス(*Sorghum Sudanese*)からゲノムDNAを単離し、ゲノムDNAライブラリーを構築し、このゲノムDNAライブラリーを構成するゲノムクローンを個別に、形質転換法によりイネ、トウモロコシ、および、タバコに導入した。用いたスーダングラスの品種は、牧草用として市販されているものである。形質転換植物およびその子孫の植物は、オリザ・ルフィポゴン由来のゲノムDNAライブラリーの換植物と同様に、温室で栽培し、植物体全体の植物体全体のビガー、草丈、相対成長率、穂長率、地上部重、穂重、穂長、可稔粒数、収量、葉数、葉長、葉幅、葉重、乾燥耐性、耐塩性、および、耐病性を調査することにより、導入したゲノム断片の効果を判定した。そして、これらの形質のうち、1つまたは複数の形質について、変異の生じた形質転換植物およびその子孫植物を選抜した。選抜された植物に導入したゲノム断片を、イネ、トウモロコシ、または、タバコに、農業的に有益となりうる変異を起こすことのできる、スーダングラス由来のゲノム断片として選抜した。

## 【0098】

実施例12. ミレット由来のゲノムDNAライブラリーによる、イネ、トウモロコシ、および、タバコの形質転換と、形質転換植物の評価

オリザ・ルフィポゴンの場合と同様に、ミレット(*Seteria italica*)からゲノムDNAを単離し、ゲノムDNAライブラリーを構築し、このゲノムDNAライブラリーを構成するゲノムクローンを個別に、形質転換法によりイネ、トウモロコシ、および、タバコに導入した。用いたミレットの品種は、牧草用として市販されている極早生イタリアンミレットRである。形質転換植物およびその子孫の植物は、オリザ・ルフィポゴン由来のゲノムDNAライブラリーの場合と同様に、温室で栽培し、植物体全体の植物体全体のビガー、草丈、相対成長率、穂長率、地上部重、穂重、穂長、可稔粒数、収量、葉数、葉長、葉幅、葉重、乾燥耐性、耐塩性、および、耐病性を調査することにより、導入したゲノム断片の効果を判定した。そして、これらの形質のうち、1つまたは複数の形質について、変異の生じた形質転換植物およびその子孫植物を選抜した。選抜された植物に導入したゲノム断片を、イネ、トウモロコシ、または、タバコに、農業的に有益となりうる変異を起こすことのできる、ミレット由来のゲノム断片として選抜した。

## 【0099】

実施例13. ギニアグラス由来のゲノムDNAライブラリーによる、イネ、トウモロコシ、および、タバコの形質転換と、形質転換植物の評価

オリザ・ルフィポゴンの場合と同様に、ギニアグラス(*Panicum maximum*)からゲノムDNAを単離し、ゲノムDNAライブラリーを構築し、このゲノムDNAライブラリーを構成するゲノムクローンを個別に、形質転換法によりイネ、トウモロコシ、および、タバコに導入した。用いたギニアグラスの品種は、牧草用として市販されているカラードギニアグラスである。形質転換植物およびその子孫の植物は、オリザ・ルフィポゴン由来のゲノムDNAライブラリーの場合と同様に、温室で栽培し、植物体全体の植物体全体のビガー、草丈、相対成長率、穂長率、地上部重、穂重、穂長、可稔粒数、収量、葉数、葉長、葉幅、葉重、乾燥耐性、耐塩性、および、耐病性を調査することにより、導入したゲノム断片の効果を判定した。そして、これらの形質のうち、1つまたは複数の形質について、変異の生じた形質転換植物およびその子孫植物を選抜した。選抜された植物に導入したゲノム断片を、イネ、トウモロコシ、または、タバコに、農業的に有益となりうる変異を起こすことのできる、ギニアグラス由来のゲノム断片として選抜した。

## 【0100】

実施例14. 選抜されたゲノムDNAクローンの解析

選抜されたゲノムDNA断片の両端280～500塩基分の塩基配列を調査した。その結果も表1から9および図3の各々のゲノムDNA断片に対応する配列番号により示されている。また、これらの断片をPCR法により検出することができる、PCR用プライマーペアの配列を以下の表10に示す。

## 【0101】

【表10a】

表10：

選抜された、オリザ・ルフィポゴンのゲノムに由来するゲノムDNA断片の例と、それを検出することができるPCR用プライマーペア

選抜されたゲノムDNA断片	検出用プライマーペア1	検出用プライマーペア2
A029B04	5' - TCGAATTTGACCATGAGATACAGA-3' (配列番号 47) 5' - AAGAAAAAAATGCTTGTGTACTGA-3' (配列番号 48)	5' - TCGAGCTAATTAACTAGCCAAGTG-3' (配列番号 49) 5' - AAGTAACATGAGAAAAAAAAACAT-3' (配列番号 50)
A028C04	5' - TCGATTAAGACAGCAGGACGGTGG-3' (配列番号 51) 5' - GCAAGTGCCGTTCACATGGAACCT-3' (配列番号 52)	5' - TCGAGGGCGTTGCGCCCCCGATGC-3' (配列番号 53) 5' - CCGTCTTGAAACACGGACCAAGGA-3' (配列番号 54)
A048F12	5' - TCGATGTAGTCCTCCTCGAGGCCG-3' (配列番号 55) 5' - CAACAACCGAGCAATACTAGTTCAA-3' (配列番号 56)	5' - TCGAGTGGTCGGCGTCCCCGGCC-3' (配列番号 57) 5' - CCGGAGTTCACCATGCCCGGGC-3' (配列番号 58)
A049A01	5' - TCGAACTAACGCTAACAAACGTGCA-3' (配列番号 59) 5' - ATTTGGCGCATCTGAACACTGAAC-3' (配列番号 60)	5' - TCGAGTGCATCCTCTTCTCAATG-3' (配列番号 61) 5' - GTTTTTGTTCGTTACAATGAGAAC-3' (配列番号 62)
A046A06	5' - TCGAACTACCGAGCTCCCCTAAT-3' (配列番号 63) 5' - GTAGCTGAAAGGCATAACCGTACC-3' (配列番号 64)	5' - TCGAACTTGTCTTCCAATTGGCGT-3' (配列番号 65) 5' - AACCCCGAACTTCAATCAAGTCCC-3' (配列番号 66)
A045B09	5' - TCGACGACGACGCCGGCGAACCGA-3' (配列番号 67) 5' - CCGCCGCATCCGCCGTCCCCCGCG-3' (配列番号 68)	5' - TCGAGGATGCCTGTGGAGTGGTGT-3' (配列番号 69) 5' - CCGTGGACCGCCGCTTCGTTCCC-3' (配列番号 70)
A049A07	5' - TCGAGCAGTCCGCCGGCAGCCGAC-3' (配列番号 71) 5' - ATTTCCCGAGCCGGACGTGGCGG-3' (配列番号 72)	5' - TCGAACCATCTAGTAGCTGGTTCC-3' (配列番号 73) 5' - GCTTCAGCGCCATCCATTTCGGG-3' (配列番号 74)

【0102】

【表10b】

選抜されたゲノムDNA断片	検出用プライマーペア1	検出用プライマーペア2
A040D06	5'-TCGACGGGTTCTGAAACCTGGGAT-3' (配列番号 75) 5'-GAGCAGCCCGCCGTACCTAT-3' (配列番号 76)	5'-TCGAGCCCCAACTTCGTTCTTG-3' (配列番号 77) 5'-AGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGT-3' (配列番号 78)
A036A03	5'-TCGAAAATGACCGTCAACAAAACC-3' (配列番号 79) 5'-ATCAAAAAGGCATCATTTGGTGAG-3' (配列番号 80)	5'-TCGATGCATTGAGCAGAAAGGAAT-3' (配列番号 81) 5'-ATATTCTTCACCAAAAAGTATCT-3' (配列番号 82)
A051E08	5'-TCGATGAAGAACGTAGCGAAATGC-3' (配列番号 83) 5'-ATATGCTTAAACTCAGCGGGTAGT-3' (配列番号 84)	5'-TCGATGCGAGAGCCGAGATATCCG-3' (配列番号 85) 5'-CCCGTCGCTCCTACCGATTGAATG-3' (配列番号 86)
A023D09	5'-TCGACGCCATACTGATGAGCAATG-3' (配列番号 87) 5'-GTTGATGCTCTCTCGCGTCATC-3' (配列番号 88)	5'-TCGAATGCCAGTTAAAGTGTGCC-3' (配列番号 89) 5'-CTACTGCGCCGAGCCCACGCTGAG-3' (配列番号 90)
A030B02	5'-TCGAAGCTCACAGTTGATAACTT-3' (配列番号 91) 5'-GAGGTTTCGAACCCAGGTTGTCTA-3' (配列番号 92)	5'-TCGAGGTGAACTATTTTTTCTT-3' (配列番号 93) 5'-GGCCCTCGGGGCCGAGGCGGGAGT-3' (配列番号 94)
A043F04	5'-TCGACCACCTCTCAGAACGAAAA-3' (配列番号 95) 5'-AACATCCAACAGATTGAGACACTT-3' (配列番号 96)	5'-TCGATAGCACCATGGGACTATAC-3' (配列番号 97) 5'-TGATTGAAACAAATTAGGGTATT-3' (配列番号 98)
A049E02	5'-TCGATTAAGACAGCAGGACGGTGG-3' (配列番号 99) 5'-CCCGGCTCGGGAAATCTAACCCG-3' (配列番号 100)	5'-TCGACCGAATCGGGTTTCGGTCG-3' (配列番号 101) 5'-GGATGGCCGGCTGCCACGCGCAC-3' (配列番号 102)
A010C09	5'-TCGACCGAATCGGGTTTCG-3' (配列番号 103) 5'-ACCGAAAATGTGTGCGAGC-3' (配列番号 104)	5'-TCGATGTCGGCTCTCCTAT-3' (配列番号 105) 5'-GGGCTGGATCTCAGTGGATC-3' (配列番号 106)

【0103】

【表10c】

選抜されたゲノムDNA断片	検出用プライマーペア1	検出用プライマーペア2
A011C02	5'-TCGAGTTAGGGATTTGATTG-3' (配列番号107) 5'-AATTTGTAATGCTGCGATCT-3' (配列番号108)	5'-TCGAAGGTGGTGTCAAATTA-3' (配列番号109) 5'-GTTGTCGCTGCCACCTGATC-3' (配列番号110)
A010B03	5'-TCGAACAGCCGACTCAGAAC-3' (配列番号111) 5'-CCCGGATCGGCCCGAGGGAC-3' (配列番号112)	5'-TCGAAGGATCAAAAGAAC-3' (配列番号113) 5'-GGCTTGGCGGAATCAGCGGG-3' (配列番号114)
A009F06	5'-TCGAGTTGATTGGATTTCG-3' (配列番号115) 5'-GGCGGCGGCGGCTCGGCCGA-3' (配列番号116)	5'-TCGAATAGCCGTGCCCGCGG-3' (配列番号117) 5'-TCTAACGCAGCGAAAATAAA-3' (配列番号118)
A009E11	5'-TCGAGTTGGAGCACGCCGT-3' (配列番号119) 5'-GTTGTTACACACTCCTTAGC-3' (配列番号120)	5'-TCGAGGCGGCCGCCGC-3' (配列番号121) 5'-CCTATCGATCCTTTAGACCT-3' (配列番号122)
A008B02	5'-TCATATATTAATTCTCTCTCTA-3' (配列番号123) 5'-TCATGATAGTCAATATGGGCCCTC-3' (配列番号124)	5'-TCGAAGACGCCGAATGGTAGTGAA-3' (配列番号125) 5'-GGATAGAGATATGGTATAAGAAAT-3' (配列番号126)
A083G04	5'-TCGATGGTAGGATAGGGCCTACC-3' (配列番号127) 5'-TTAAGGCCAGGAGCGCATGCCGG-3' (配列番号128)	5'-TCGAGTTATCATGAATCATCGGAT-3' (配列番号129) 5'-GACAGCCCGCCGGCCGCCGT-3' (配列番号130)
A088E02	5'-TCGAGCCTCCACCAGAGTTCTC-3' (配列番号131) 5'-CGGCTGGTCCGCCGATCGGCTCGG-3' (配列番号132)	5'-TCCAGGCGTGGAGCCTGGGCTTA-3' (配列番号133) 5'-TGCAATGATCTATCCCCATCACGA-3' (配列番号134)
A089F12	5'-TCGAGCAGTCCGCCGGCAGCCGAC-3' (配列番号135) 5'-ATTCCCGAGCCGGGACGTGGCGG-3' (配列番号136)	5'-TCGAACAGCCGACTCAGAACTGGT-3' (配列番号137) 5'-CTCAAGTCATTTCACAAAGTCGGA-3' (配列番号138)

## 【0104】

実施例15. 選抜されたゲノムDNA断片の植物への導入  
 実施例1～13において選抜されたゲノムDNA断片を、実施例2、実施例5、または、  
 実施例3～13において選抜されたゲノムDNA断片を、実施例2、実施例5、または、

実施例6記載の方法により、イネ、トウモロコシ、およびタバコに導入した。得られた形質転換植物、およびその子孫植物を、実施例3～13と同様に評価した。そして、評価した形質のうち、1つまたは複数の形質について、変異の生じた形質転換植物およびその子孫植物を選抜した。選抜された植物に導入したゲノム断片を、イネ、トウモロコシ、またはタバコに、農業的に有益となりうる変異を起こすことのできるゲノム断片として選抜した。

#### 【0105】

2次選抜の結果、再度植物に導入しても農業上有益な変異をもたらすことができる事が確認されたゲノムDNA断片や、他の植物にも農業上有益な変異をもたらすことができる事が確認されたゲノムDNA断片が選抜された。したがって、1次選抜のみの場合よりも、より価値の高いゲノムDNA断片が選抜されることになる。

#### 【0106】

このようにして選抜されたゲノムDNA断片の例を表11に示す。

#### 【0107】

【表11】

表11： 2次選抜で選抜されたゲノムDNA断片

由来植物	ゲノム DNA 断片	1 次選抜に用いた植物	1 次選抜において認められた形質変異	2 次選抜に用いた植物	2 次選抜において認められた変異
オリザ・ルフ イポゴン	A009E11 (SEQ ID NO:37 SEQ ID NO:38)	イネ	草丈の増	イネ トウモロコシ	草丈の増 草丈の増
オリザ・ルフ イポゴン	A009F06 (SEQ ID NO:35 SEQ ID NO:36)	イネ	草丈の増	イネ トウモロコシ	草丈の増 草丈の増
オリザ・ルフ イポゴン	A010B03 (SEQ ID NO:33 SEQ ID NO:34)	イネ	草丈の増	イネ トウモロコシ	草丈の増 草丈の増
オリザ・ルフ イポゴン	A010C09 (SEQ ID NO:29 SEQ ID NO:30)	イネ	草丈の増	イネ トウモロコシ	草丈の増 草丈の増
オリザ・ルフ イポゴン	A011C02 (SEQ ID NO:31 SEQ ID NO:32)	イネ	草丈の増	イネ トウモロコシ	草丈の増 草丈の増

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0108】

【図1】図1は、クローニングベクターpSB200の遺伝子地図である。

【図2】図2は、クローニングベクターpSB25UNpHmの遺伝子地図である。

【図3】図3は、穂の大きさの外部観察、一穂の粒数、および、植物全体のビガーに基づき選抜された形質転換植物の例と対象植物を示す写真である（世代：T0、被選抜系統数：5310）。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Japan Tobacco Inc.

&lt;120&gt; A method for selecting genomic DNA fragment.

&lt;130&gt; 03-1959

&lt;160&gt; 138

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 400

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Oryza rufipogon

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; A029B04 F: one terminus of DNA fragment A029B04.

&lt;400&gt; 1

tcaattttga ccatgagata cagatataaa tcggtagaat cattataaaggc atgattactg	60
attcttaaaa agatgttgac aaatccagat tcccaattcc tcgcaggcct aatttaattt	120
tcccccatgg cacagggcca gcggggtcga tcaatcaacta tgggagccat actattgttag	180
aagttctcaa tgagatattt gcaagcaatg tggcagaact ctctgtgcag atagtgaagg	240
tagctctgcc atgtacacag gaggtaggtg atgaaccaggc accctgtgtt tttaacaact	300
agataagggtg ttggcttct attgttaggc tgcatggcat atatatattt agtagaaatgt	360
aacatgcaggc acatttcag tacacaagca tttttttctt	400

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 400

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Oryza rufipogon

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; A029B04 R: the other terminus of DNA fragment A029B04 to A029B04 F.

&lt;400&gt; 2

tcgagctaat taactagcca agtgttaggt tggttagacat ctggatatac cttctgacgt	60
tttcctatgt gtaaaactact gagattttgtt atggcagttt ctgtggcact tgcacaaggg	120
ccagtttat tcctccttga actgttaatta accacctttt tcaccgaccc tccttcgag	180
tagcttagaga catttctaca tgctcgaaatt aattttttaa tgcttaggaac tggatcccta	240
ttttttagttt acagaagttt ctagctactc tggatccatgt ttctcacggg gtgcagctag	300
ctagcttcga taaacagctc aaaaaacaga aattttttcc tggcaaatgt atgtgccaat	360
cttaatgcattt gagaatatgt tttttttctt catgttactt	400

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 300

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Oryza rufipogon

&lt;220&gt;

<223> A028C04 F: one terminus of DNA fragment A028C04.

<400> 3

tcgattaaga cagcaggacg gtggcatgg aagtgcataat ccgcttaaggaa gtgtgttaaca	60
actcacctgc cgaatcaact agccccgaaa atggatggcg ctgaagcgcc cgaccacac	120
caggccatct gggcgagcgc catgccccga ttagttaggag ggcgcggcgg ccgcccggaaa	180
acccggggcg cgagccggg cggagcggcc gtcgggtcag atcttggtgg tagtagcaaa	240
tattcaaaat agaactttga agggcgaaga ggagaaaggt tccatgtgaa cggcacttgc	300

<210> 4

<211> 400

<212> DNA

<213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A028C04 R: the other terminus of DNA fragment A028C04 to A028C04 F.

<400> 4

tcgagggcgt tgcccccgt atgcctctaa tcattggctt tacccgatacg aactcgtaat	60
gggcctccagc tatcctgagg gaaacttcgg aggaaaccag ctactagatg gttcgattag	120
tcttcgccc ctatacccaa gtcagacgaa cgattgcac gtcagtatcg cttcgagcct	180
ccaccagagt ttccctctggc ttcccccgc tcaggcatag ttcaccatct ttccgggtccc	240
gacaggcgtg ctccaactcg aacccttcac agaagatcg ggtcgccag cggtcgcc	300
cgtgagggcc tcccgctcgt cagcttcctt gcgcatccca ggtttcagaa cccgtcgact	360
cgcacgcattc ttagactcct tggccgtgt ttcaagacgg	400

<210> 5

<211> 400

<212> DNA

<213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A048F12 F: one terminus of DNA fragment A048F12.

<400> 5

tcgatgttgt ctcctcgag gccgaggctg acagagatgg cgccgagaag ccggagcccc	60
agtgcggca cttctcgca gtacgtgctc ataatcttc tgcattgcag gaaaaagtgc	120
aacggaaaat taagcgtcca cgcctaatt ttggcgttt actgaaacta gttgctgtcc	180
tggacttcag ctatgttgat ttactccag cacattggat ttggaaatta acagacgaag	240
taggagaccg atgaagaatc ggtcccttc ttttgcgag gtcaagggtg cggttacct	300
tttccacgat ttgtctcgag taaaaatctc gcaagttcat gcatgtctt ggttagggta	360
tttagtcttct acgtgattga actgtattgc tcgggttttg	400

<210> 6

<211> 400

<212> DNA

<213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A048F12 R: the other terminus of DNA fragment A048F12 to A048F12 F.

&lt;400&gt; 6

tcgagtggc	ggcgcccccc	ggccggctc	catacggctg	gccacggcg	acggcactga	60
gctgccta	ccgtggaa	aca tcgaacac	ctcgcttc	tacccctgag	gggggggtcg	120
ggtgcagg	ttcgggctcg	ggccaacccc	gcacccctc	ggcgtgcag	gttggccgg	180
ggcgtgcc	acatgcacat	tcttatttct	cttattcag	tatttcaata	aaagcagttt	240
caattccta	aaggctgtat	ctgtgtgtt	gttcttttg	aagaatctt	acttgaata	300
ggtcactcgt	gctcaatcct	gccctcgggg	gctcgggtcg	gctaaaatcg	ccaaacgggg	360
cccagaaccg	agccgtcccc	cggggcatgg	tgaactccgg			400

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 400

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Oryza rufipogon

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; A049A01 F: one terminus of DNA fragment A049A01.

&lt;400&gt; 7

tcgaactaac	gctaacaacg	tgcagaaaat	ctccctgcat	ctcgtatgg	ttcattggat	60
cgttgtggc	tccaataagt	ggggcttcca	ggcccatctt	gctggggccc	aatagtaccg	120
aaaacgaaag	tagcaccaag	cttccatgca	cgacgacaga	aacgagcgat	gacattgtt	180
tttcttggg	aagaaggaca	acacaaccg	tccgttagct	tgtccatttc	gaccctaagt	240
ggtcaaaaat	gattggagaa	ttagtcacca	aaataaataa	ttgtactagt	tctaagttct	300
gataacacaa	ctagtgacca	accatgacta	gttctttaga	gatgggttc	agattttcag	360
tacagagccg	acgcaagttc	agtgttcaga	tgcgccaat			400

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 400

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Oryza rufipogon

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; A049A01 R: the other terminus of DNA fragment A049A01 to A049A01 F.

&lt;400&gt; 8

tcgagtgcc	tcctcttctc	aatgagagta	accattgaaa	ttctaacatc	tattccatca	60
taaattctt	tttggaggcag	ctgttttgt	cttgacaatt	aaaacgcgt	ttaagaaaaa	120
caccgctt	tctattacaa	tatttgctg	tggatttcc	ctgattaata	ccatatgaac	180
tttatctta	catattgcat	tgtcttcatc	gccaaaagt	agtactttc	agtttctt	240
ttctatata	gcagcacaga	tgattttgtt	ttagaacat	atgatacaga	gataacaacc	300
gaatcaaccc	catttgctat	tgcacttgca	aaacatttgc	actctgttgg	cgctaagatg	360
tatggagcat	tctgggttc	tcattgtaac	gaacaaaaac			400

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 400

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Oryza rufipogon

&lt;220&gt;

<223> A046A06 F: one terminus of DNA fragment A046A06.

<400> 9

tcgaactacc gagctccccc taatcattc gtctccaag aagacgacgt gtctcgttc	60
tacaaactt gtataattgt ttggataata gaaacgataa cctttgatc tttcaggata	120
gcgaataaaa tggcagctga ctatTTTggg atccaatttc caaggttgg gtaaatatt	180
ttagcctcta caggactccc ccacacatgg aggtgagcta gcgagggtac tcttcccgtc	240
catagctcat acagtgttg ggcaccgatt tgcttggAAC tctgttggagg atatgaatgg	300
cgtttttaa tgtctctatc cataaaaccca atggtagagt ggagtagctc atcatgctgc	360
gcaccatatac cataaggta cggttacgcc tttcagctac	400

<210> 10

<211> 400

<212> DNA

<213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A046A06 R: the other terminus of DNA fragment A046A06 to A046A06 F.

<400> 10

tcgaacttgt cttccaattt gcgtacctct tgtcgatatg ccatcatgtt gtcgtcaagg	60
caggaccact ctttcataaac ttgggtgaca actagctgtg aatgcctcg aactattaga	120
cgttttatcc ctagagaaaat tgcgatccgc agtccatggg ggagcgcctc gtactcggcg	180
acgttgtgag acgcccaaaa atgtatccaa agcacatgc ttaatcttc tccagtcggg	240
gaaattaaaaa ccactcctgc tccagtgccc gaaagtgcgt tcgaccgtc gaaatgcata	300
gtccagtgcgt caatcttctc cgccccgtt tcctcctggc actcggtcca ttcggcgaca	360
aaatcagcta acgcttggaa cttgattgaa gttcgggggtt	400

<210> 11

<211> 400

<212> DNA

<213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A045B09 F: one terminus of DNA fragment A045B09.

<400> 11

tcgacgacga cgccggcgaag ccgaaggagg cggcaccgag aggggaggaa gtccggagcg	60
acggccggcg cgaaccggag ctcgtcggcg acggcggaga gagaggaaga cgacgcgagc	120
gcgattccga cggtgagagc gagcggcgaa cggcggaaac ggaggagaga ggcgcgaggg	180
acgcttaaat agcgacggga gggggagaga gcccggcgag agggagaaat cggccgcgga	240
aatctcggcc gccattgatt ggcggcgaa ggaatgcggg agagaatccg gacgcattccg	300
agggagagag agagggggga aacgggagag ggaatgcgg ggaatgattc	360
cccttcatt atggcgcgcg gggacggcg gatgcggcg	400

<210> 12

<211> 400

<212> DNA

<213> Oryza rufipogon

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; A045B09 R: the other terminus of DNA fragment A045B09 to A045B09 F.

&lt;400&gt; 12

tcgaggatgc ctgtggagtg gtgtccgc tgcagttcaa gtcaggctt agtccagtt	60
ttctttgtt ttccgctca tttctgttaag acttttatga tgttttaag acgtggatct	120
gaatgtcaac atagtcgtt gtgtaccccg gccggcctg gacgggggtt ttaatgcaca	180
ttctgcttgg aatcctattc gggatttct gggcgtgaca gcggctgaca gccggcccc	240
acgcggcagc cgctcggtgc gcccgaaggc ggccacggcg gcgcggccgg cgggaggcgg	300
ctcggccgca cccctatggc cgccggcgcc ggccataggc acgtcgagc agcggccgag	360
agaggggaggaa aacaaggcgg cggtccacgg	400

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 400

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Oryza rufipogon

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; A049A07 F: one terminus of DNA fragment A049A07.

&lt;400&gt; 13

tcgagcagtc cgccggcagc cgacgggttc gggccggga ccccgagcc cagccctcag	60
agccaatcct ttcccgaag ttacggatcc gtttgccga cttcccttgc ctacatttgtt	120
ccattggcca gaggctgttc accttggaga cctgatgcgg ttatgagttac gaccggcgt	180
ggacggtaact cggtccctcg gatttcaag ggccgccggg ggcgcaccgg acaccgcgc	240
acgtcggtg ctctccggc cgctggaccc tacctccggc tgaaccgtt ccagggttgg	300
cggccgtta agcagaaaag ataactttc ccgaggcccc cgccggcgtc tccggacttc	360
ctaacgtcgc cgtcaaccgc cacgtcccg ctcggaaat	400

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 400

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Oryza rufipogon

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; A049A07 R: the other terminus of DNA fragment A049A07 to A049A07 F.

&lt;400&gt; 14

tcgaaccatc tagtagctgg ttccctccga agttccctc aggatactg gagccatta	60
cgggtctat cggtaaagc caatgattag aggcatcggtt ggcgcacgc cctcgaccta	120
ttctcaaact ttaaataggt aggacggcgc ggctgctccg gtgagccgcg ccacggaatc	180
gggagctcca agtggccat ttttggtaag cagaactggc gatgcgggat gaaccggaaag	240
cctggttacg gtgcgaact ggcgcataac ctagaaccctt caaagggtgt tggtcgat	300
agacagcagg acgggtgtca tggaaagtgcg aatccgctaa ggagtgtgt acaactcacc	360
tggccaatca actagcccccg aaaatggatg ggcgtgaagc	400

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 400

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Oryza rufipogon

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; A040D06 F: one terminus of DNA fragment A040D06.

&lt;400&gt; 15

tcgacgggtt ctgaaacctg ggatgcgcaa ggaagctgac gagcggagg ccctcacggg	60
ccgcaccgct ggccgaccct gatctctgt gaagggttcg agttggagca cgcctgtcg	120
gaccggaaag atggtaact atgcctgagc ggggcgaagc cagagggaaac tctggtgag	180
gctcgaagcg atactgacgt gcaaattcggt cgtctgactt gggtataggg gcgaaagact	240
aatcgaaacca tcttagtagct ggtccctcc gaagttccc tcaggatagc tggagcccat	300
tacgagttct atcggttaaa gccaatgatt agaggcatcg ggggcgcaac gccctcgacc	360
tattctcaaa cttaataatag gtaggacggc gcggctgctc	400

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 400

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Oryza rufipogon

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; A040D06 R: the other terminus of DNA fragment A040D06 to A040D06 F.

&lt;400&gt; 16

tcgagccccc aactttcggtt ctgtttaat gaaaacatcc ttggcaaatg ctttcgcagt	60
tgttcgttta tcataaaatcc aagaattca cctctgacta tgaaatacga atgc(ccc)ga	120
ctgtccctat taatcattac tccgatcccg aaggccaaca caataggacc ggaatcctat	180
gatgttatcc catgctaattg tatccagagc gatggcttgc tttgagcact ctaatttctt	240
caaagtaacg ggcgcggagg cacgaccggg ccagtaagg ccaggagcgc atgc(ccg)ca	300
gaagggtcga gcaggtcggt gctcgccgtg aggccgaccg gccggccccgg cccaagggtcc	360
aactacgagc ttttaacttca caacaactta aatatacgt	400

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 400

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Oryza rufipogon

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; A036A03 F: one terminus of DNA fragment A036A03.

&lt;400&gt; 17

tcgaaaatga ccgtcaacaa aaccccccac gcttgaacct ttgctcatcc cgagtgaagg	60
acgaaaggaa acaaagactt ggatgttgcata cagaagttgc tactatgtgc cttatctcaa	120
agatacagggt gcaaggcata tgtactctt ctttagattaa ataatcttgc gcatgggtggc	180
ttatccttac ccctgattct catgagacac tacttcttgc tgccttgggc ggttgaaga	240
cagaacaaca attagagcac caatcaccgg atctttatttca aattcttattt ctggaaagg	300
ttcaaatgtat ttgcaaaga aaaccaaggc cctcaaatgat ttcaactcgt ctctctaagt	360
gtatcatttc gaattcctca ccaaataatgc cctttttgtat	400

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 400

&lt;212&gt; DNA

<213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A036A03 R: the other terminus of DNA fragment A036A03 to A036A03 F.

<400> 18

tcgatgcatt gagcagaaag	aatattgtatcaagcaat	tatccaaggat	tgcccacatg	60
aactgcaaaa ggaaatacaa	caattaagat	tggagttac	agaacccgga	120
ctcttagaggt aaaaccaaca	catttagatc	aagtctgtga	tgctcagaag	180
aattagaaga aatttgacac	ggagttcaaa	aaagaattga	aatggatttt	240
atgatggagc tcttagattt	aaaggacgtc	tttgcattcc	agacaggaaa	300
attaatttt gcaagaagcc	catcgctcac	tctttctat	ccatcctgga	360
tgtatcatga cctaaaagat	acttttggt	ggaagaatat		400

<210> 19

<211> 400

<212> DNA

<213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A051E08 F: one terminus of DNA fragment A051E08.

<400> 19

tcgatgaaga acgttagcgaa	atgcgatacc	tggtgtgaat	tgcagaatcc	cgtgaaccat	60
cgagtcttg aacgcaagtt	gcgcggagg	ccatccggcc	gagggcacgc	ctgcctggc	120
gtcacgccaa aagacgctcc	acgcgcffff	cctatccggg	agggcgccgg	gacgcgtgt	180
ctggcccccc gcgcctcgcg	gcgcgggtgg	ccgaagctcg	ggctgcggc	gaagcgtgcc	240
ggcacagcg catggtgac	agctcacgct	ggctctaggc	cgcagtgcac	ccggcgcgc	300
ggccggcgcg atggccctc	aggacccaaa	cgcaccgaga	gcgaacgcct	cggaccgcga	360
ccccaggtca ggcggacta	cccgctgagt	ttaagcatat			400

<210> 20

<211> 400

<212> DNA

<213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A051E08 R: the other terminus of DNA fragment A051E08 to A051E08 F.

<400> 20

tcgatgcgag agccgagata	tccgttgccg	agagtcgtgt	ggatttagct	cgtggtatcg	60
cgccgcgcgc	cgggacggcc	agggccgacc	gggcggcgc	ggggcgatc	120
ttgacgcccgt	cggccgcgt	ggttctgtt	cggccgggg	gcctcggtt	180
gagcgctcg	cggcagggg	tgacgcgttc	gcggctgtt	ttggtcaggg	240
gatcctccg	caggttcacc	tacggaaacc	ttgttacgac	ttctccttcc	300
aaggttcaat	ggacttctcg	cgacgtcgaa	ggcggcgaac	cgcccccgtc	360
gaacacttca	ccggaccatt	aatcggtag	-gagcgacggg	gccgcgatcc	400

<210> 21

<211> 300

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Oryza rufipogon

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; A023D09 F: one terminus of DNA fragment A023D09.

&lt;400&gt; 21

tcgacgccat actgatgagc aatgattcgta aatactacta attaatctag cagcatgata	60
cggagcatca acgttaagta agatgaggcag catccatcaa gaagaaggaa gcgttcctc	120
cactggcgag tgacaccacg ctcttgcct gtaccactat cgctacttaa tgcctaatcc	180
tcctcctgtc gtacaagtac cacgaaacag aatataaaca ataaagacaa gttttttaa	240
aaaaaaaaatttgc tctgaagattt aattaagatg tagtgagatg acgcagagaa gagcatcaac	300

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 360

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Oryza rufipogon

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; A023D09 R: the other terminus of DNA fragment A023D09 to A023D09 F.

&lt;400&gt; 22

tcgaatgcca gttaaagtga tgccattcca gcgaatcaac tcttgcgtatg gtagatgtgc	60
aattttctca ccagatttgg ctgatagcca ttatgtctgt gtactattaa acctgctctg	120
atctagggtt ccagcccccc accacggccg cacagccatg gatgaggcatc caagcagcca	180
cgcgcgagcg tgtgtggagg cggcccagac tgaagcaaat cagaaatctg gtgtatggtaa	240
tggtaaggc gaggcacacca aaccaaaaac caaataaaaa gctcaactga aacaaacgta	300
cgaatcatcc atccatcgcg cgggtggc tcagatctca gcgtggcgtc ggcgcgttag	360

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 300

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Oryza rufipogon

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; A030B02 F: one terminus of DNA fragment A030B02.

&lt;400&gt; 23

tcgaagcttc acagttgata acttgacatg gtcatcagca ctatacatgt catgttggga	60
gttagcagcc ttcaactagt accttattag gtgcctgaat aatcgagggtg gtataattca	120
ttcagacatg tgcccgtaa aacctttagg gaaacttaaa ttatggcctt tacattaaaa	180
aaactaaaaat tattttctta aaaaaactta aattatggtt cagactctac aagaaacgcc	240
cataagtctt tcgacttagct tcacaagggtg gtgggctaga caacctgggt tcgaaacctc	300

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 280

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Oryza rufipogon

&lt;220&gt;

<223> A030B02 R: the other terminus of DNA fragment A030B02 to A030B02 F.

<400> 24

tcgaggtaaa ctatttttt tcttttttta agttcggttat tcttttcttt actacggtaa	60
atttcagtaa atacaaggag tacatcaatt ttccgaaaaa ttctatccc aattgtcggt	120
gacatgggac cgggagtatc atgactagag gcttgaggca gacacaatcg cccacgtggc	180
ctggcacccct cgggggacgt cggcccgag ggtgatgtgt tcgcctcct ctttgtctcc	240
ccgaggggggt cgaccacactc ccgcctcgcc cccgagggcc	280

<210> 25

<211> 400

<212> DNA

<213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A043F04 F: one terminus of DNA fragment A043F04.

<400> 25

tcgaccacct tctcagaagc aaaatgtaca aacagagggt gctgaagaag attcgagttt	60
ccattggcac aattcagatg gcagtccaca tgctgagctt gaagatagac atggatacag	120
acacaagagg gcacgtcgca cgcgtattgc tggagctcgc gcctgacccct caggtggaga	180
gctttcctgg tattcgcct gcaatctcct cactgctcag cacaaacaag ggggccacaa	240
acagtgaaag ctccagcaac ccaatcactg cagtggcgga cgcaacttta aaatatagat	300
gggacggaga acggagatgt tcactcgata agagcaatcg aacacaacac atatcgatt	360
aatagtttat tcgtataagt gtctcaatct gttggatgtt	400

<210> 26

<211> 400

<212> DNA

<213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A043F04 R: the other terminus of DNA fragment A043F04 to A043F04 F.

<400> 26

tcgatagcac cattggact atactggaca taccaactaa gaccaaggat aggctgaaat	60
cacgttagga cctcgtggat atgcaaataa ggaaagagta ccttccgcct gcttgctaca	120
ccttgcacaa agaggacaaa attgcattgt gcaaattccct acatggggtg agagtgccta	180
ctgccttcctc ctcaaacatt aagcgactag tgctgatgaa ggatctgtcg ctttcaggct	240
acaattctca taactgtcat gtaatgctca cagtattcct tgccattgca actagagcag	300
tcgaacccac gtctgcagaa attagcacca tatacaatcc ttacatttat tcgaaatgca	360
gaataacata acatacaata ccctaaattt gttcgaaatca	400

<210> 27

<211> 400

<212> DNA

<213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A049E02 F: one terminus of DNA fragment A049E02.

<400> 27  
tcgattaaga cagcaggacg gtggcatgg aagtgcggat ccgttaaggaa gtgtgttaaca 60  
actcacctgc cgaatcaact agccccgaaa atggatggcg ctgaagcgcc cgaccacac 120  
caggccatct gggcgagcgc catgccccga ttagttaggag ggcgcggcgg ccccccggaaa 180  
acccggggcg cgagcccccggg cggagcggcc gtcgggtcgag atcttgggtgg tagtagcaaa 240  
tattcaaatg agaacttga aggccgaaga ggagaaaggt tccatgtgaa cggcacttgc 300  
acatgggtaa gccgatccta agggacgggg taacccggc agagagcgcg accacgcgcg 360  
tgcccccggaaa gggaaatcgaaa ttaagatttc ccgagccggg 400

<210> 28  
<211> 400  
<212> DNA  
<213> Oryza rufipogon

<220>  
<223> A049E02 R: the other terminus of DNA fragment A049E02 to A049E02 F.

<400> 28  
tcgaccgaat cgggtttcg gtcggtcggc cgggtgggtgg ctgcacgagc cagcccttcc 60  
caactcgcc acgggttgcg gtcggtcggc cggcgccccg aacgtggacc gaaccgggtg 120  
ccgtgcgcgt ggcagcccg ccatcccttc cccctacta tagtcgtggg ccatagccag 180  
ccccacgcac ccctagcgtc cagcccttca cagctcgac acagtttgc gccgggtcgcc 240  
cggcggaccg aacgtcgacc gaatcggtt ttccgggtt cggccgggtgg gtggctgcac 300  
gagccagccc ttcccaactc ggcacgggtt gccggtcggc cggccggcgc cccgaacgtg 360  
gaccgaaccg ggtggccgtgc gcgtggcagc ccggccatcc 400

<210> 29  
<211> 500  
<212> DNA  
<213> Oryza rufipogon

<220>  
<223> A010C09 F: one terminus of DNA fragment A010C09.

<400> 29  
tcgaccgaat cgggtttcg gtcggtcggc caggggggtg gtcgcacgag ccagcccttc 60  
ccaactcgcc cacgggttgcg gtcgggtcgcc cccggccccg gaacgtggacc cgaaccgggt 120  
gccgtgcgcg tggcagcccg gccatcccttc cccctacta atagtctggg gccatagccca 180  
gcccaacgcac cccttagcgt ccagcccttc acagctcgac cacagtttc ggccgggtcg 240  
cggcggaccg gaacgtcgac cgaatcggtt ttccggccgg tcgggtggctg cacgagccag 300  
cccttccca ctcgcgcacg gttggccgtc ggtggcccg ggcaccaac gtggaccgaa 360  
ccgggtggccg tgcgcgtggc agcccgccca tcccttccccc cctactatag tcgtggggcc 420  
atagccagcc caacgcaccc ctgcgtgca gcccttcaca gctgcacac agtttcgggt 480  
cgncgancg gggaccgaa 500

<210> 30  
<211> 500  
<212> DNA  
<213> Oryza rufipogon

<220>  
<223> A010C09 R: the other terminus of DNA fragment A010C09 to A010C09 F.

<400> 30  
tcgatgtcgg ctttccatat cattgtgaag cagaattcac caagtgttgg attgttcacc 60  
caccaatagg gaacgtgagc tgggttaga ccgtcgtag acaggttagt ttaccctac 120  
tgcgtaccgt gcccgcata taattcaacc tagtacgaga ggaaccgtt attcacacaa 180  
ttggtcatcg cgcttggtt aaaagccagt ggcgcgaagc taccgtgtgc cggattatga 240  
ctgaacgcct ctaagtcaaga atccaagcta gcaagcggcg cctgcgcggcc cggccggcc 300  
cgaccacgt taggggcgca agcccccaag ggcccggtgcc accggccaag cggccggc 360  
cgacgcgcgc cggccggccg cctcgaagct ccctcccaa cggcggcg gctgaatct 420  
ttgcagacga cttaataacg cgacgggca ttgttaagtgg cagagtggcc ttgctgccac 480  
gatccactga gatccagccc 500

<210> 31  
<211> 500  
<212> DNA  
<213> Oryza rufipogon

<220>  
<223> A011C02 F: one terminus of DNA fragment A011C02.

<400> 31  
tcgagttagg gatttggattt aagagtcaat cattagcca tgcactcaag tttcaagttt 60  
gagattttagt tgaagagtca atcaatctt aacctgtggg ttaagtagat acatcccta 120  
taaatatcga tatattttaga aatacggtaa ttaccatattt ataagaaaacg gtaatttcca 180  
caagaatacg gtaaatacga aaatgatcg tacaacagca aaaccatttc cgttctgtt 240  
tccatatttt ttaccatttc catatttttt ggtcgattat catttccata tagctcgcc 300  
ggttaaaagt aaaaaacgaa cggcagtcgg ccggaaatta cggttaccat tttcacctt 360  
aagccaaacg atggtggcct tagcatccac agttcaactt ccatctaaa gaaaaaaagaa 420  
aaaggattga agcttcatgc cgagtgaaac catggatgc tgttagtaaca cagacgctaa 480  
agatcgacgca attacaattt 500

<210> 32  
<211> 500  
<212> DNA  
<213> Oryza rufipogon

<220>  
<223> A011C02 R: the other terminus of DNA fragment A011C02 to A011C02 F.

<400> 32  
tcgaagggtgg tgtcaaattt tagccagcca atacatgaac aagtttagaaa actgtcaaaa 60  
cccaattcat caatagttga gatttggatgg tggtatattt ttttccctt tttctgatta 120  
tgaccttttta ggggtttaat ttgtatattt tttctctgg aactttgcac gtttgttaaa 180  
aaaaaacagt tgggactttt caagaaaaaa aaaacggccg gagcactgtc aaacgaactc 240  
actaataggc ctcgaatct tattgggctt ttcacgaaca aaggccata aatgttagcc 300  
catttaggcc caaactgtac atcaccgcgtg attaaacggc ccagccaaa catcataaca 360  
ctggataggg tgcagacaag ggtcccaccc gtcagatccc gacacgtcat cattgcccgt 420

ccgcttccag aagcagcggc aagtttccat ctccttcttc cccttggctt tttatcgctc 480  
gatcagggtgg cagcacaac 500

<210> 33  
<211> 500  
<212> DNA  
<213> Oryza rufipogon

<220>  
<223> A010B03 F: one terminus of DNA fragment A010B03.

<400> 33  
tcgaacagcc gactcagaac tggcacggac aagggaaatc cgactgtta attaaaacaa 60  
agcattgcga tggcctcgc ggatgctgac gcaatgtat ttctgcccag tgctctgaat 120  
gtcaaagtga agaaattcaa ccaagcgcgg gttaacggcg ggagtaacta tgactcttt 180  
aaggtagcca aatgcctcgt catctaatta gtgacgcgc tgaatggatt aacgagattc 240  
ccactgtccc tgtctactat ccagcgaac cacagccaag ggaacggct tggcggaaatc 300  
agcggggaaa gaagaccctg ttgagcttga ctctagtcg actttgtgaa atgacttgag 360  
aggtgttagga taagtgggag ccctcggcgc caagtaaaat accactactt ttaacgttat 420  
tttacttatt ccgtgagtgcg gaagcggggc ctggccctc ctttggctc taaggcccga 480  
gtccctcggg ccgatccggg 500

<210> 34  
<211> 500  
<212> DNA  
<213> Oryza rufipogon

<220>  
<223> A010B03 R: the other terminus of DNA fragment A010B03 to A010B03 F.

<400> 34  
tcgaaggatc aaaaagcaac gtcgctatga acgcttggct gccacaagcc agttatccct 60  
gtggtaactt ttctgacacc tctagcttca aactccgaag gtctaaagga tcgataggcc 120  
acgcttcac ggttcgtatt cgtactggaa atcagaatca aacgagctt tacccttttg 180  
ttccacacga gatttctgtt ctcgttgagc tcacatcttgcgt tatcttttaa 240  
cagatgtgcc gccttccac ctgacaatgt cttccggccg gatcggcccg 300  
aggacttcgg gccttagagc caaaaaggagg ggccaggccc cgcttccgac tcacggata 360  
agtaaaataa cgtaaaaagt agtggattt cacttgcgcc cgagggcctc cacttacctt 420  
acacctctca agtcatattca caaagtgcgaa ctagagtcaa gctcaacagg gtcttcttc 480  
ccgctgatt ccgcggaa 500

<210> 35  
<211> 500  
<212> DNA  
<213> Oryza rufipogon

<220>  
<223> A009F06 F: one terminus of DNA fragment A009F06.

<400> 35

tcgagtttga ttcggattcg ttttccccg aagttccctt ctcgccgcg gtcgcgtgg	60
gcctccgtcg ccgcttgcta gccccttat aaggatcccc ggtgtctcct ctacccgcgc	120
ccaccctcgc cttcgccctc cgccgcgc agagccctag cgccgtgcaa ccttgcgcgc	180
ccgtcgccgc cgtcgctcca atcgtgcgcc gccgtcgctc cagccgtcgc cgtcgctcgg	240
gaagaccgtc atcgtggtcg ccgtcgctc gccgtccctcg tccgcccctt cgccgtcgcc	300
ggagatcgcc ggagcgtcat cgccgcgc gacccgaaga gcttcgcgcgt ttccctctcg	360
tgcgcgtcac cgtccgttgc ctctccgcgc tgccttggc cgtcggttag ttgcgcgtgc	420
cgtccgcgtac ccgttggcgc ctccgtttc cgccctcgcc ccgcgcgcgc agccgtccgc	480
tccgcccggc cgccgcgcgc	500

<210> 36  
<211> 500  
<212> DNA  
<213> Oryza rufipogon

<220>  
<223> A009F06 R: the other terminus of DNA fragment A009F06 to A009F06 F.

<400> 36	60
tcgaatagcc gtgcccgcgg ttatggcgg gtctaacaat gtcttcgtg attagtctca	120
ccctctcac catagtaaat gatgtataaa ttggtaataaa ttgattagc tcctggtttg	180
aatggata ttccctggttt ggagatagaa ctgtgcagcc gggatggttt ttcagattgg	240
ttggcctat acaacagggg atgttgtata gcgttggatt aatactgctt aattaatatt	300
taactgtttt aaattctcaa atgttgcta aatgctgctt ttgcaaattgg agccctattt	360
tgccatcctt tggttatccctg tgcaatttgc tatttgcgtc gtggcttgcgt gagtatgtca	420
tataactcacc ttgcaatcat tcattcagag gaagagttct tcagtgaagc ttagtgggtg	480
gaggattagg tgtagccctt gtaagctgc ctgtggagtg gagccgtcta cgctgtttat	500
tttattttcc gctgtttaga	

<210> 37  
<211> 500  
<212> DNA  
<213> Oryza rufipogon

<220>  
<223> A009E11 F: one terminus of DNA fragment A009E11.

<400> 37	60
tcgagtttga gcacgcgtgt cgggaccgcg aagatggta actatgcctg agcggggcga	120
agccagagga aactctggtg gaggctcgaa gcgatactga cgtcaaatc gttcgtctga	180
cttgggtata gggcgaaag actaatcgaa ccatcttagta gctggttccc tccgaagttt	240
ccctcaggat agctggagcc cattacgagt tctatcggtt aaagccaatg attagaggca	300
tcggggcgcg aacgcctcg acctattctc aaactttaaa tagtaggac ggcgcggctg	360
ctccgggtgag ccgcgcacg gaatcggtt ccacaaatgg gccattttt gtaagcagaa	420
ctggcgatgc gggatgaacc ggaagcctgg ttacgggtgcc gaactgcgcg ctaacctaga	480
acccacaaag ggtgttggc gattaagaca gcaggacggt ggtcatggaa gtcgaaatcc	500
gcttaaggagt gtgttaacaac	

<210> 38  
<211> 500

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Oryza rufipogon

<220>  
 <223> A009E11 R: the other terminus of DNA fragment A009E11 to A009E11 F.

&lt;400&gt; 38

tcgaggcggc cggccgcggc gcgtcgccg ggccggcttg gccgggtggca cgggccccttg	60
ggggcttgcgc cccctaacgt gggtcggggc gggcggcggc cgccaggcgcc gcttgcgtac	120
ttggattctg acttagaggc gttcagtcat aatccggcac acggtagctt cgcccaactg	180
gctttcaac caagcgcgtat gaccaattgt gtgaatcaac gttcctctc gtactaggtt	240
gaattactat cgccggcacgg tcatcagtag ggtaaaacta acctgtctca cgacggctca	300
aaccaggctc acgttcccta ttgggggtg aacaatccaa cacttggta attctgcttc	360
acaatgatag gaagagccga catcgaagga tcaaaaagca acgtcgctat gaacgcttgg	420
ctgccacaag ccagtttatcc ctgtggtaac tttctgaca cctctagctt caaactccga	480
aggcttaaag gatcgatagg	500

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 400

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Oryza rufipogon

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; A008B02 F: one terminus of DNA fragment A008B02.

&lt;400&gt; 39

tcatatatta attctctctc tctaaaaata taaaaaaaag gagtctgcgc accgagatct	60
gccataaaag gtccaagcca taacaagtga gaagctatac ggctcaattc taacataatt	120
accctaatat agctggctct ttggggattt tgaatattct ccaagaattc tggcattt	180
accgttattt cttctgtaaa catagtagct aaataatccc aacgtgttac ataaggtaag	240
tattgtataa tagttcggtt ttccgcgatt tttccattc ctctgtgtaa atagcctaatt	300
atgggttac aatcaataac atcttcacca tcgagagtaa cgatcagtgc aagaacacca	360
tgcattgatg ggtgctgagg gccccatattt actatcatga	400

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 500

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Oryza rufipogon

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; A008B02 R: the other terminus of DNA fragment A008B02 to A008B02 F.

&lt;400&gt; 40

tcgaagacgc ggaatggtag tgaatagaga gaaagattct tctggtttc ttgttcctga	60
aaatattcta tctatctctt agacgcccgtt gagaatttag aattttcatg tctttcaatt	120
ctcgactcg taattggaaa gttacggaaag gagatccatc attttgcaat gaaaactaca	180
taaaaaactc tggacaattt cggaaatcagg ccaagcgtct taatacatat gaaaaaaaaat	240
tcattattgg cccaccattt attagaagat ttaacttgc tgaatcgctt ttgggttgc	300
acgataatgt gcagtgtttt cagtatgtt aggatacaga tgtatccaca attcatttag	360
agttacttaa tagccttattt cttataccat atctctatcc	400

<210> 41  
<211> 400  
<212> DNA  
<213> Oryza rufipogon

<220>  
<223> A083G04 F: one terminus of DNA fragment A083G04.

<400> 41

tcgatggtag gataggggcc taccatggtg gtgacgggtg acggagaatt agggttcgat	60
tccggagagg gagcctgaga aacggctacc acatccaagg aaggcagcag gcgcgcaaat	120
tacccaatcc tgacacgggg aggtagtgc aataaataac aataccggc gctttagtgt	180
ctggtaattt gaatgagttac aacttaaaatc ccttaacgag gatccattgg agggcaagtc	240
tgggccagc agcccggtt attccagctc caatagcgta tatttaagtt gttcagttt	300
aaaagctcgat agttggacct tggccgggc cgccggcgc gcctcacggc gagcaccgac	360
ctgctcgacc ctctgcggc cgatgcgctc ctggccttaa	400

<210> 42  
<211> 360  
<212> DNA  
<213> Oryza rufipogon

<220>  
<223> A083G04 R: the other terminus of DNA fragment A083G04 to A083G04 F.

<400> 42

tcgagttatc atgaatcatc ggatcagcgg gcggagcccg cgtcagccct ttatctaata	60
aatgcgc(ccccc tcccgaaatg cggggtttgt tgcacgtatt agctctagaa ttactacggt	120
tatccgagta gcacgtacca tcaaacaac tataactgtat ttaatgagcc attcgcagtt	180
tcacagttcg aattagttca tacttgacca tgcattggcatt aatctttgag acaagcatat	240
gactactggc agatcaacc agtagcact tcctccgcga cgagcccgcc ccgtccgacg	300
cgcgtcgcccg ccgccccccgg gtcgggagcgc gcggacacgg cggcggccgg gcgggctgtc	360

<210> 43  
<211> 400  
<212> DNA  
<213> Oryza rufipogon

<220>  
<223> A088E02 F: one terminus of DNA fragment A088E02.

<400> 43

tcgagcctcc accagagttt cctctggcatt cgcccgctc aggcatagtt caccatctt	60
cgggtcccgaa caggcgtgct ccaactcgaa cccttcacag aagatcaggc tcggccagcg	120
gtgcggcccg tgagggcctc cgcgtcgatc gcttccttgc gcatcccagg tttcagaacc	180
cgtcgactcg cacgcgtgtc agactccttg gtccgtgtt caagacgggt cgatgggga	240
gccccgaggc cggtcagcg cagcccccg agggcgcgc cagaggcgcgc cggtgaccgg	300
ctgcgcgac gacggctgccc gggggcgcgg agccccccggg ctttggccgc cggcgcggcc	360
gacaacggtc cacgccccga gccgatcgcc ggaccagccg	400

<210> 44  
<211> 400  
<212> DNA  
<213> Oryza rufipogon

<220>  
<223> A088E02 R: the other terminus of DNA fragment A088E02 to A088E02 F.

<400> 44

tccaggcgtg gagcctgcgg cttaatttga ctcaacacgg ggaaacttac caggtccaga	60
catagcaagg attgacagac ttagagctct ttcttatttc tatgggttgt ggtgcattggc	120
cgttcttagt tggtggagcg atttgtctgg ttaattccgt taacgaacga gacctcagcc	180
tactaactag ctatgcggag ccatccctcc gcagctagct tcttagaggg actatggccg	240
tttaggccac ggaagtttga ggcaataaca ggtctgtat gcccttagat gttctggcc	300
gcacgcgcgc tacactgtatg tattcaacga gtatatagcc ttggccgaca ggcccgggta	360
atcttggaa atttcatcgt gatgggata gatcattgca	400

<210> 45  
<211> 400  
<212> DNA  
<213> Oryza rufipogon

<220>  
<223> A089F12 F: one terminus of DNA fragment A089F12.

<400> 45

tcgagcagtc cgccggcagc cgacgggttc gggccggga ccccgagcc cagccctcag	60
agccaatcct ttccccgaag ttacggatcc gtttgccga cttcccttc ctacattttt	120
ccattggcca gaggctgttc accttggaga cctgatgcgg ttatgagttac gaccggcgt	180
ggacggtaact cggccctccg gatttcaag ggccgcggg ggcgcaccgg acaccgcgc	240
acgtgcggtg ctctccggc cgctggaccc tacctccggc tgaaccgtt ccagggttgg	300
cgggccgtta agcagaaaag ataactcttc ccgaggcccc cgccggcgtc tccggacttc	360
ctaacctcgc cgtcaaccgc cacgtcccg ctcggaaat	400

<210> 46  
<211> 360  
<212> DNA  
<213> Oryza rufipogon

<220>  
<223> A089F12 R: the other terminus of DNA fragment A089F12 to A089F12 F.

<400> 46

tcgaacagcc gactcagaac tggtaacggac aaggggaaatc cgactgttta attaaaacaa	60
agcattgcga tggctctcgc ggatgctgac gcaatgtat ttctgcccag tgctctgaat	120
gtcaaagtga agaaattcaa ccaagcgcgg gtaaacggcg ggagtaacta tgactcttt	180
aaggttagcca aatgcctcgt catctaatta gtgacgcgc tgaatggatt aacgagattc	240
ccactgtccc tgtctactat ccagcgaac cacagccaag ggaacggcgt tggcggaaatc	300
agcggggaaa gaagaccctg ttgagcttga ctctagtcg actttgtgaa atgactttag	360

<210> 47  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A029B04 F.

<400> 47  
tcgaatttga ccatgagata caga

24

<210> 48  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A029B04 F.

<400> 48  
aagaaaaaaaaa tgcttgtgtta ctga

24

<210> 49  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A029B04 R.

<400> 49  
tcgagctaat taactagccaa agtg

24

<210> 50  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A029B04 R.

<400> 50  
aagtaaacatg agaaaaaaaaa acat

24

<210> 51  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; forward primer for amplifying DNA fragment A028C04 F.

&lt;400&gt; 51

tcgattaaaga cagcaggacg gtgg

24

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; reverse primer for amplifying DNA fragment A028C04 F.

&lt;400&gt; 52

gcaagtgcgcg ttcacatggaa acct

24

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; forward primer for amplifying DNA fragment A028C04 R.

&lt;400&gt; 53

tcgagggcgt tgcgcccccgt atgc

24

&lt;210&gt; 54

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; reverse primer for amplifying DNA fragment A028C04 R.

&lt;400&gt; 54

ccgtcttgaa acacggacca agga

24

&lt;210&gt; 55

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; forward primer for amplifying DNA fragment A048F12 F.

&lt;400&gt; 55

tcgatgttagt cctcctcgag gccg

24

<210> 56  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A048F12 F.

<400> 56  
caacaaccga gcaatacagt tcaa 24

<210> 57  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A048F12 R.

<400> 57  
tcgagtggtc ggcgcccccc ggcc 24

<210> 58  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A048F12 R.

<400> 58  
ccggagttca ccatgccccg gggc 24

<210> 59  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A049A01 F.

<400> 59  
tcgaactaac gctaacaacg tgca 24

<210> 60  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A049A01 F.

<400> 60

atttggcgca tctgaacact gaac

24

<210> 61

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying DNA fragment A049A01 R.

<400> 61

tcgagtgccca tcctcttctc aatg

24

<210> 62

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A049A01 R.

<400> 62

gtttttgttc gttacaatga gaac

24

<210> 63

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying DNA fragment A046A06 F.

<400> 63

tcgaactacc gagctccccc taat

24

<210> 64

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A046A06 F.

<400> 64

gtagctgaaa ggcgttaaccg tacc

24

<210> 65

<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A046A06 R.

<400> 65 24  
tcgaaacttgt cttccaaattt gcgt

<210> 66  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A046A06 R.

<400> 66 24  
aaccccgaaac ttcaatcaag tccc

<210> 67  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A045B09 F.

<400> 67 24  
tcgacgacga cgcggcgaag ccga

<210> 68  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A045B09 F.

<400> 68 24  
ccgccgcatac ccgcgcgtcccc cgcg

<210> 69  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A045B09 R.

<400> 69  
tcgaggatgc ctgtggagtg gtgt 24

<210> 70  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A045B09 R.

<400> 70  
ccgtggaccg ccgcattcggtt tcgg 24

<210> 71  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A049A07 F.

<400> 71  
tcgagcagtc cgccggcagc cgac 24

<210> 72  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A049A07 F.

<400> 72  
attccccgag ccgggacgtg gcgg 24

<210> 73  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A049A07 R.

<400> 73  
tcgaaccatc tagtagctgg ttcc 24

<210> 74  
<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A049A07 R.

<400> 74

gcttcagcgc catccattt cggg

24

<210> 75

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying DNA fragment A040D06 F.

<400> 75

tcgacgggtt ctgaaacctg ggat

24

<210> 76

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A040D06 F.

<400> 76

gaggagccgc gccgtcctac ctat

24

<210> 77

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying DNA fragment A040D06 R.

<400> 77

tcgagccccc aactttcggtt cttg

24

<210> 78

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A040D06 R.

<400> 78  
agcgtatatt taagtttgtt cagt 24

<210> 79  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A036A03 F.

<400> 79  
tcgaaaatga ccgtcaacaa aacc 24

<210> 80  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A036A03 F.

<400> 80  
atcaaaaagg catcatttgg tgag 24

<210> 81  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A036A03 R.

<400> 81  
tcgatgcatt gagcagaaag gaat 24

<210> 82  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A036A03 R.

<400> 82  
atattcttcc accaaaaagt atct 24

<210> 83  
<211> 24  
<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying DNA fragment A051E08 F.

<400> 83

tcgatgaaga acgttagcgaa atgc

24

<210> 84

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A051E08 F.

<400> 84

atatgcttaa actcagcggg tagt

24

<210> 85

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying DNA fragment A051E08 R.

<400> 85

tcgatgcgag agccgagata tccg

24

<210> 86

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A051E08 R

<400> 86

cccgatcgctc ctaccgattg aatg

24

<210> 87

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying DNA fragment A023D09 F.

<400> 87

出証特2005-3006221

tcgacgccat actgatgagc aatg 24  
<210> 88  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence  
  
<220>  
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A023D09 F.  
  
<400> 88 24  
gttgatgctc ttctctgcgt catc  
  
<210> 89  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence  
  
<220>  
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A023D09 R.  
  
<400> 89 24  
tcgaatgcca gttaaagtga tgcc  
  
<210> 90  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence  
  
<220>  
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A023D09 R.  
  
<400> 90 24  
ctactgcgcc gagcccacgc tgag  
  
<210> 91  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence  
  
<220>  
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A030B02 F.  
  
<400> 91 24  
tcgaagcttc acagttgata act  
  
<210> 92  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A030B02 F.

<400> 92  
gaggtttcga acccaggttg tcta 24

<210> 93  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A030B02 R.

<400> 93  
tcgaggtgaa ctatTTTT tctt 24

<210> 94  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A030B02 R.

<400> 94  
ggccctcgaa gcccaggcg gggt 24

<210> 95  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A043F04 F.

<400> 95  
tcgaccacct tctcagaagc aaaa 24

<210> 96  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A043F04 F.

<400> 96  
aacatccaaac agattgagac act 24

<210> 97  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A043F04 R.

<400> 97  
tcgatagcac cattgggact atac

24

<210> 98  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A043F04 R.

<400> 98  
tgattcgaac aaatttaggg tatt

24

<210> 99  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A049E02 F.

<400> 99  
tcgattaaga cagcaggacg gtgg

24

<210> 100  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A049E02 F.

<400> 100  
cccggtcgaaatcttaa cccg

24

<210> 101  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>

出証特2005-3006221

<223> forward primer for amplifying DNA fragment A049E02 R.

<400> 101

tcgaccgaat cgggtttcg gtcg

24

<210> 102

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A049E02 R.

<400> 102

ggatggccgg gctgccacgc gcac

24

<210> 103

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying DNA fragment A010C09 F.

<400> 103

tcgaccgaat cgggtttcg

20

<210> 104

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A010C09 F.

<400> 104

accaaaaact gtgtgcgagc

20

<210> 105

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying DNA fragment A010C09 R.

<400> 105

tcgatgtcgg ctcttcctat

20

<210> 106

出証特2005-3006221

<211> 20  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A010C09 R.

<400> 106 20  
gggctggatc tcagtggttc

<210> 107  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A011C02 F.

<400> 107 20  
tcgagttagg gatttgattt

<210> 108  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A011C02 F.

<400> 108 20  
aatttgtaat gctgcgatct

<210> 109  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A011C02 R.

<400> 109 20  
tcgaagggtgg tgtcaaatta

<210> 110  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A011C02 R.

<400> 110  
gttgcgtc ccacctgatc

20

<210> 111  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A010B03 F.

<400> 111  
tcgaacagcc gactcagaac

20

<210> 112  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A010B03 F.

<400> 112  
cccgatcg cccgaggac

20

<210> 113  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A010B03 R.

<400> 113  
tcgaaggatc aaaaagcaac

20

<210> 114  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A010B03 R.

<400> 114  
ggcttggcgg aatcagcggg

20

<210> 115  
<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying DNA fragment A009F06 F.

<400> 115

tcgagttga ttcggattcg

20

<210> 116

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A009F06 F.

<400> 116

ggcggcggcg gctcggcgga

20

<210> 117

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying DNA fragment A009F06 R.

<400> 117

tcgaatagcc gtgccgcgg

20

<210> 118

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A009F06 R.

<400> 118

tctaaggcgc ggaaaataaaa

20

<210> 119

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying DNA fragment A009E11 F.

<400> 119  
tcgagttgga gcacgcctgt 20

<210> 120  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A009E11 F.

<400> 120  
gttggcacac actccttagc 20

<210> 121  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A009E11 R.

<400> 121  
tcgaggcggc cggccgcggc 20

<210> 122  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A009E11 R.

<400> 122  
cctatcgatc cttagacact 20

<210> 123  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A008B02 F.

<400> 123  
tcatatatta attctctctc tcta 24

<210> 124  
<211> 20  
<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A008B02 F.

<400> 124

tcatgatagt caatatgggc cctc

24

<210> 125

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying DNA fragment A008B02 R.

<400> 125

tcgaagacgc ggaatggtag tcaa

24

<210> 126

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A008B02 R.

<400> 126

ggatagagat atggtataag aaat

24

<210> 127

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying DNA fragment A083G04 F.

<400> 127

tcgatggtag gataggggcc tacc

24

<210> 128

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A083G04 F.

<400> 128

出証特2005-3006221

ttaaggccag gagcgcatcg ccgg

24

<210> 129  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A083G04 R.

<400> 129  
tcgagttatc atgaatcatc ggat

24

<210> 130  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A083G04 R.

<400> 130  
gacagccccgc ccggccgccc ccgt

24

<210> 131  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A088E02 F.

<400> 131  
tcgagcctcc accagagttt cctc

24

<210> 132  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A088E02 F.

<400> 132  
cgctgggcc gccgatcgcc tcgg

24

<210> 133  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; forward primer for amplifying DNA fragment A088E02 R.

&lt;400&gt; 133

tccaggcgtg gagcctgcgg ctta

24

&lt;210&gt; 134

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; reverse primer for amplifying DNA fragment A088E02 R.

&lt;400&gt; 134

tgcaatgatc tatccccatc acga

24

&lt;210&gt; 135

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; forward primer for amplifying DNA fragment A089F12 F.

&lt;400&gt; 135

tcgagcagtc cgccggcagc cgac

24

&lt;210&gt; 136

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; reverse primer for amplifying DNA fragment A089F12 F.

&lt;400&gt; 136

attcccgag ccgggacgtg gcgg

24

&lt;210&gt; 137

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; forward primer for amplifying DNA fragment A089F12 R.

&lt;400&gt; 137

tcgaacagcc gactcagaac tggt

24

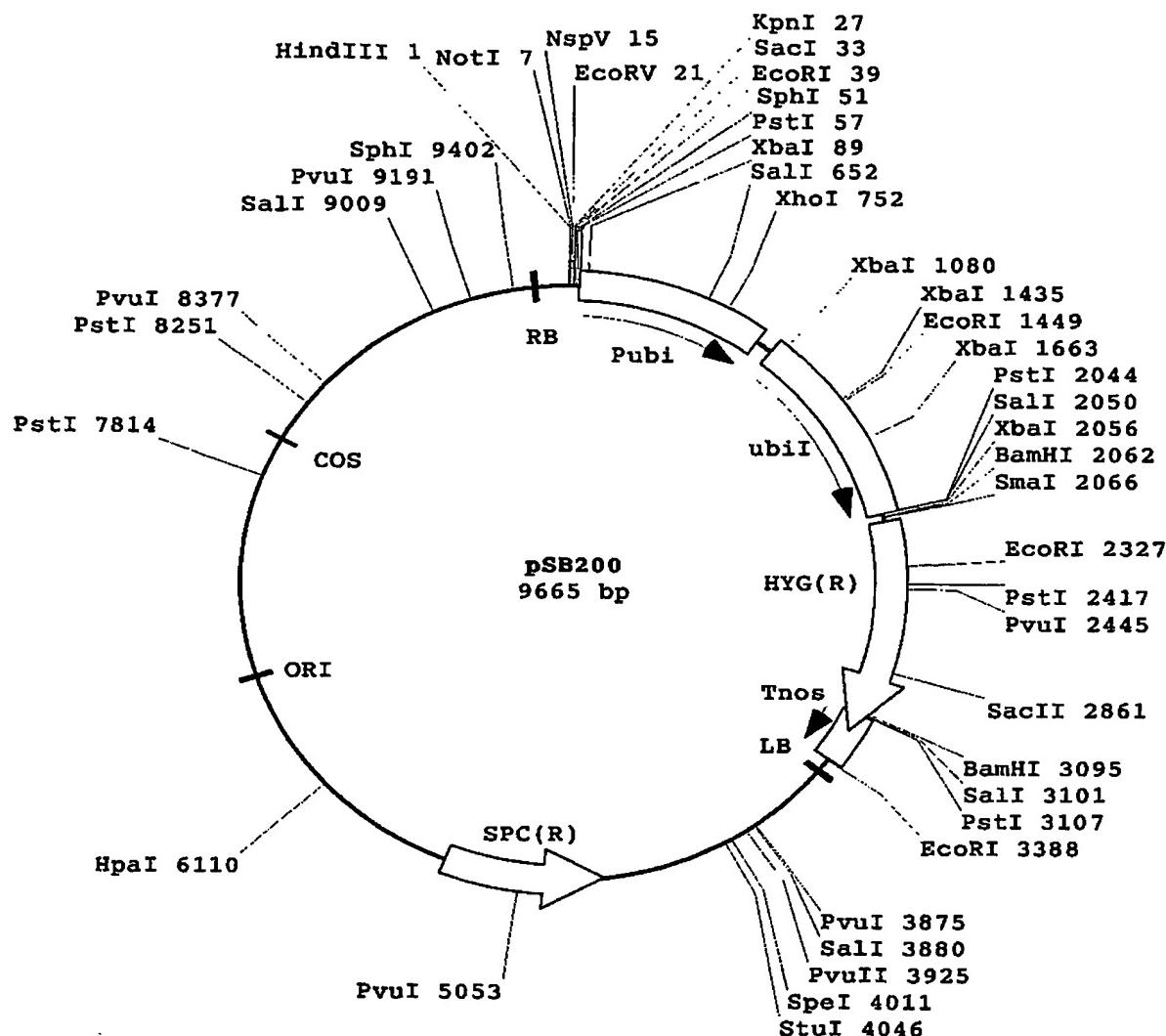
<210> 138  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A089F12 R.

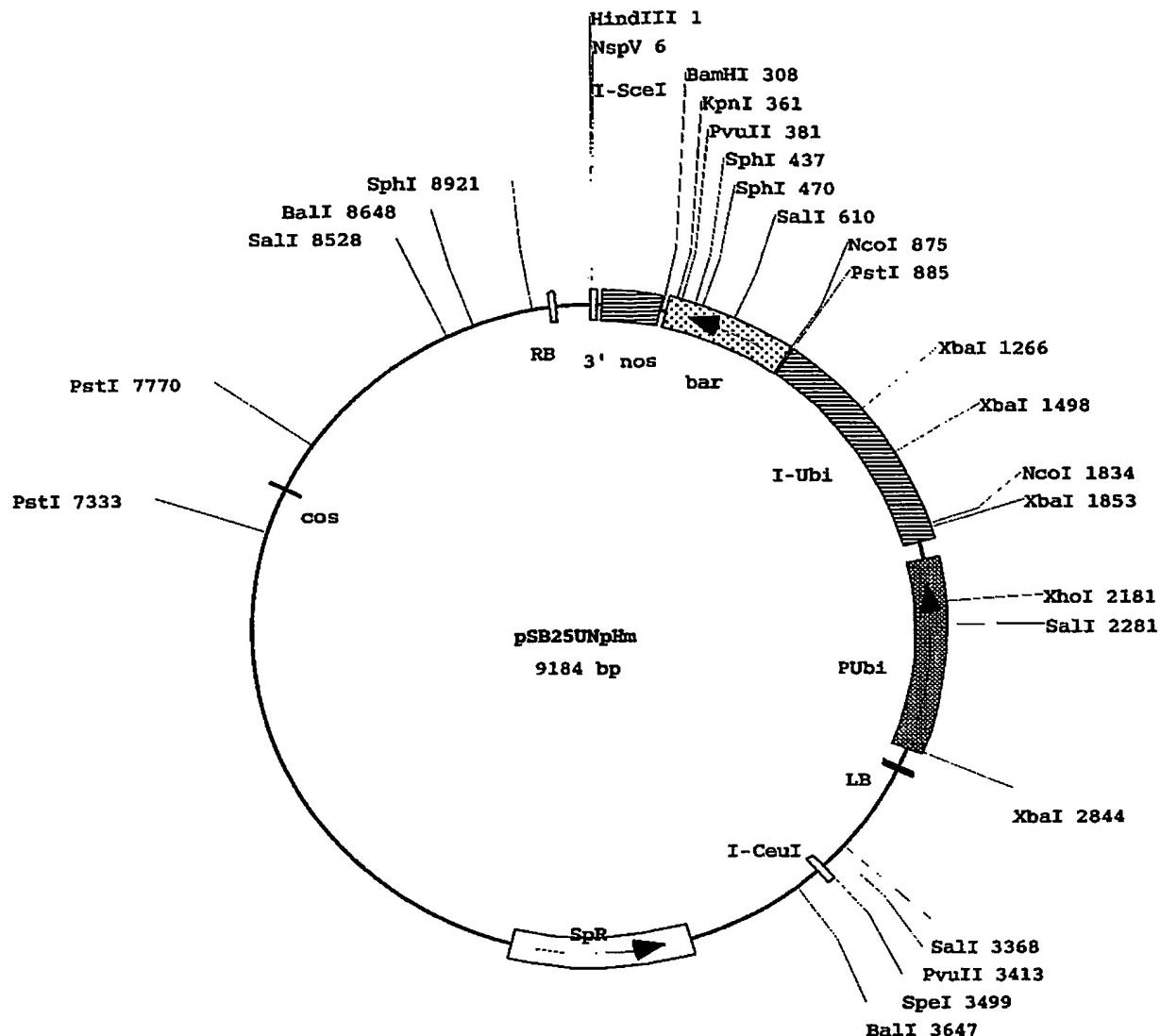
<400> 138  
ctcaagtcat ttcacaaagt cgga

24

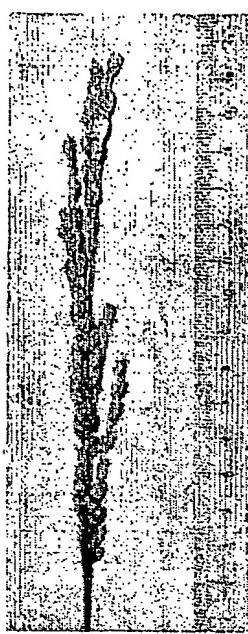
【書類名】 図面  
【図 1】



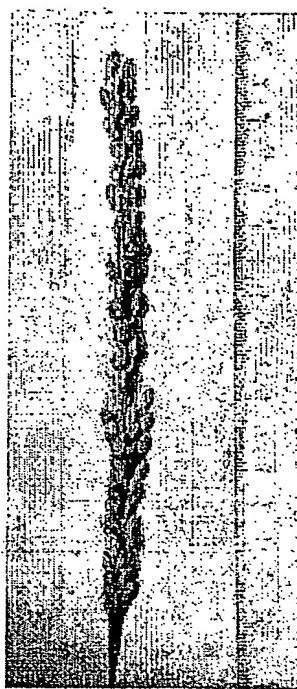
【図2】



【図3】



ゲノム断片  
A083G04  
(SEQ ID NO:41  
SEQ ID NO:42)  
導入植物



ゲノム断片  
A088E02  
(SEQ ID NO:43  
SEQ ID NO:44)  
導入植物



ゲノム断片  
A089F12  
(SEQ ID NO:45  
SEQ ID NO:46)  
導入植物



対照植物

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】要約書

【要約】

植物に導入して農業上有益となる植物の改良を行うためのゲノムDNA断片の選抜方法を提供する。

本発明の方法は、(1) 植物からゲノムDNAを調製し、クローニングベクターを用いて、ゲノムDNAライブラリーを構築し；(2) ゲノムDNAライブラリーを構成する複数のゲノムクローンの各々に含まれるゲノム断片を、個別に植物に導入し、形質転換植物を作出し；(3) 形質転換植物、または、その子孫の植物を栽培し、表現型に農業上有益となりうる変異の生じた植物を選抜し；(4) 工程(3)において選抜された植物に、工程(2)において導入されていたゲノムDNA断片を、目的とするゲノムDNA断片として選抜する；工程からなる。

【選択図】 なし

特願 2003-364682

出願人履歴情報

識別番号 [000004569]

1. 変更年月日 1995年 5月16日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都港区虎ノ門二丁目2番1号  
氏 名 日本たばこ産業株式会社

# **Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)**

International application number: PCT/JP04/015743

International filing date: 22 October 2004 (22.10.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2003-364682  
Filing date: 24 October 2003 (24.10.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 17 February 2005 (17.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse